



Joana dos Santos Pinto Martins Leal

**Efeito da suplementação com prolina no
desenvolvimento de hipertensão arterial e na produção e
eliminação de peróxido de hidrogénio – estudos em ratos
tratados com angiotensina II**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Toxicologia
Analítica Clínica e Forense

Trabalho realizado sob a orientação de:

Doutora Teresa Maria de Jesus Teixeira de Sousa
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Doutora Sónia Alexandra Teixeira Fraga
REQUIMTE, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Professora Doutora Maria de Lurdes Pinho de Almeida Souteiro Bastos
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Setembro de 2014

É autorizada a reprodução parcial desta dissertação, apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Agradecimentos

À minha orientadora, Doutora Teresa Sousa, agradeço a oportunidade que me deu e o facto de me ter introduzido numa nova área de estudos, a exigência, o apoio, as sugestões, críticas e correções que fizeram elevar os meus padrões de qualidade de trabalho.

À minha co-orientadora, Doutor Sónia Fraga, que desde o início me ajudou a encontrar um caminho para poder realizar um trabalho na área que eu pretendia, as sugestões e correções, os seus conselhos e o apoio dado em todas as etapas.

Ao Jorge Carvalho, à Eng. Joana Afonso e à Eng. Paula Serrão, pela sua disponibilidade e por me terem ajudado e orientado em tudo o que foi necessário na realização das técnicas laboratoriais.

Ao Departamento de Farmacologia e Terapêutica, pela boa disposição e familiaridade com que me receberam.

Às minhas companheiras de casa, Ana, Sara, Patrícia, Lorena e Cláudia, por todas as horas em que rimos e pela apoio dado nas alturas de maior tristeza, pelas confidências e pelo facto de poder ter sempre alguém a quem contar como correu o dia quando chegava a casa.

Às minhas amigas guias, especialmente à Tânia e à Carla, que sempre foram minhas confidentes e durante o meu percurso académico me levavam de volta às minhas origens quando precisava.

Ao BEST Porto e aos amigos que aí encontrei, que me fizeram aumentar e melhorar as minhas capacidades pessoais, por acreditarem no meu esforço e no meu trabalho e que sempre tiveram a capacidade de me fazer animar o dia.

Aos meus verdadeiros amigos, por todo o apoio, carinho, momentos partilhados em trabalho e em convívio, pelas confidências e inconfidências, pela força dado nos momentos em que estava mais em baixo e por acreditarem que sou forte e capaz de fazer sempre mais e melhor. Com eles, encontrei uma família no Porto.

Ao Tiago, porque apesar de tudo, foi a minha maior companhia no Porto durante o meu percurso académico.

Ao meu padrinho Jorge e sua família, pelo carinho com que me incentivavam e pela grande ajuda nas deslocações ao Porto;

À minha Madrinha, por ouvir os meus desabafos e ter sempre uma palavra de consolo e uma de animação.

À minha família, em especial ao meu Tio João, Tia Olga, Tio Teófilo e primos, por sempre acolherem de forma carinhosa e aconchegante e por acreditarem em mim e no meu sucesso futuro.

Aos meus irmãos, Henrique e Tiago, por me animarem e me mostrarem a sua ternura e por me fazerem querer ser melhor e um motivo de exemplo para o futuro deles.

Ao meu Pai por acreditar nas minhas capacidades e na minha força, pela preocupação com o meu bem-estar e por ter a habilidade de me fazer rir, mesmo das situações mais difíceis.

À minha Mãe, por todo o esforço que fez para que eu me formasse com distinção, pelo apoio incondicional e pelo seu amor, pelas horas sem dormir a ajudar-me em tudo o que era necessário, pela preocupação com o meu bem-estar, por não me deixar desistir quando tudo parecia perdido e por ser um exemplo de que tudo é possível desde que trabalhemos para isso.

RESUMO

A hipertensão arterial é um grave problema de saúde pública e um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais. Há necessidade de melhorar a deteção e terapêutica da hipertensão arterial, porque a percentagem de indivíduos hipertensos cuja pressão arterial está controlada é ainda muito baixa.

A angiotensina II (Ang II) desempenha um papel fundamental na regulação da pressão arterial através de efeitos como a indução da vasoconstrição e da reabsorção tubular renal de sódio. O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é um mediador da disfunção cardiovascular e renal induzida pela Ang II, contribuindo para a génese e progressão da hipertensão arterial. Por sua vez, a prolina (Pro) é um aminoácido que exerce efeitos antioxidantes protetores contra o stresse oxidativo, nomeadamente o induzido pelo H_2O_2 . Atendendo à necessidade de descobrir novos meios de controlo da hipertensão, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da Pro na prevenção da hipertensão arterial e da elevação de H_2O_2 em ratos tratados com Ang II.

A Pro (2g/kg/dia) foi administrada diariamente na água, desde o dia 0 ao dia 21, a ratos Sprague Dawley. A hipertensão foi induzida pela infusão s.c. de Ang II (200 ng/kg/min) durante 14 dias (desde o dia 7 ao dia 21). Os animais controlo (Sham) receberam uma infusão de soro fisiológico. A pressão arterial foi avaliada ao longo do estudo. Procedeu-se ainda à avaliação de marcadores de stresse oxidativo (H_2O_2 e isoprostanos urinários) e da disponibilidade de monóxido de azoto (NO^*) (nitratos e nitritos urinários), bem como à determinação da produção renal de H_2O_2 e da atividade renal da catalase e da GPx.

A infusão de Ang II causou uma elevação significativa da pressão arterial e um aumento tendencial da excreção urinária de H_2O_2 e de isoprostanos. Na medula renal aumentou também a produção de H_2O_2 e a atividade da GPx. O tratamento com Pro preveniu a elevação da pressão arterial induzida pela Ang II mas não alterou a pressão arterial dos ratos Sham. Nos ratos tratados com Ang II, o tratamento com Pro também aumentou marcadamente a excreção urinária de nitratos e nitritos e de H_2O_2 e atenuou a produção de H_2O_2 e a atividade da GPx na medula renal.

Podemos concluir que a Pro previne a hipertensão arterial causada pela Ang II. Apesar deste aminoácido ter atenuado o stresse oxidativo na medula renal de ratos tratados com Ang II, o seu efeito anti-hipertensor parece estar relacionado com o aumento da síntese de NO, evidenciado por uma maior excreção urinária de nitratos e nitritos, e que resulta provavelmente da ligação do ciclo da Pro ao ciclo de produção de arginina.

Palavras-chave: hipertensão, angiotensina II, H_2O_2 , prolina, NO.

ABSTRACT

Hypertension is a serious public health problem and a major risk factor for the development of cardiovascular and renal diseases. There is a need to improve the detection and treatment of hypertension since the percentage of hypertensive patients whose blood pressure is controlled is still very low.

Angiotensin II (Ang II) plays a fundamental role in blood pressure regulation by promoting vasoconstriction and renal tubular reabsorption of sodium. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is a mediator of cardiovascular and renal dysfunction induced by Ang II, thus contributing to the genesis and progression of hypertension. On the other hand, proline (Pro) is an amino acid that exerts protective antioxidant effects against oxidative stress, particularly that induced by H_2O_2 . Given the need to find new ways to control hypertension, this study aimed to evaluate the effectiveness of Pro in the prevention of hypertension and H_2O_2 rise in rats treated with Ang II.

Pro (2 g /kg /day) was administered in the drinking water, from day 0 to day 21, to Sprague Dawley rats. Hypertension was induced by s.c. infusion of Ang II (200 ng / kg / min) for 14 days (from day 7 to day 21). Control animals (Sham) received an infusion of saline. Blood pressure was measured throughout the study. We evaluated biomarkers of oxidative stress (urinary H_2O_2 and isoprostanes) and nitric oxide (NO^*) availability (urinary nitrate and nitrite), as well as renal production of H_2O_2 and renal activity of catalase and GPx.

Ang II infusion significantly increased blood pressure and tendentially augmented urinary excretion of H_2O_2 and isoprostanes. Ang II also increased H_2O_2 production and GPx activity in the renal medulla. Treatment with Pro prevented the blood pressure rise induced by Ang II but did not alter blood pressure in Sham rats. In rats treated with Ang II, Pro treatment markedly increased the urinary excretion of nitrates and nitrites and H_2O_2 and decreased H_2O_2 production and GPx activity in the renal medulla.

We can conclude that Pro prevents Ang II-induced hypertension. Although this amino acid has attenuated renal medullary oxidative stress in Ang II-infused rats, its antihypertensive effect seems to be related with increased NO synthesis, as evidenced by the increased urinary excretion of nitrates and nitrites, and probably results from the interrelationship of Pro cycle with the cycle responsible for arginine production.

Keywords: hypertension, angiotensin II, H_2O_2 , proline, NO.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
1.INTRODUÇÃO	13
1.1) Hipertensão arterial.....	13
1.2) Stresse oxidativo e hipertensão arterial.....	15
1.2.1) ROS.....	15
1.2.2) Fontes de ROS.....	16
1.2.2.1) Enzimas da cadeia respiratória mitocondrial	17
1.2.2.2) NAD(P)H oxidases	17
1.2.2.3) Xantina oxidoreductase.....	18
1.2.2.4) Sintetases do NO [•]	19
1.2.2.5) Mieloperoxidase	20
1.2.3) Defesas antioxidantes	20
1.2.3.1) Defesas antioxidantes enzimáticas	20
1.2.3.2) Defesas antioxidantes não enzimáticas.....	21
1.2.4) Stresse oxidativo e hipertensão arterial	22
1.2.5) Hipertensão causada por diferentes ROS.....	23
1.3) Sistema renina-angiotensina	25
1.3.1) Ang II, hipertensão e H ₂ O ₂	27
1.4) Prolina.....	29
1.4.1) Prolina e stresse oxidativo	30
1.5) Objetivos	33
2.MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1) Animais e desenho experimental	34
2.2) Indução da hipertensão e avaliação da pressão arterial.....	35
2.3) Colheita de urina, sangue e rins.....	35
2.4) Homogeneização de tecidos	36
2.5) Quantificação de proteínas.....	36
2.5.1) Quantificação de proteínas do sobrenadante.....	36
2.5.2) Quantificação de proteínas totais.....	37

2.6) Doseamento de H_2O_2	37
2.6.1) Excreção urinária de H_2O_2	37
2.6.2) Produção renal de H_2O_2	38
2.7) Avaliação da atividade da catalase	38
2.8) Avaliação da atividade da GPX	39
2.9) Doseamento de isoprostanos.....	39
2.10) Doseamento de nitratos e nitritos	40
2.11) Análise estatística dos resultados	41
3. RESULTADOS.....	41
3.1) Estudo metabólico.....	42
3.1.1) Efeito da suplementação com Pro no peso corporal	42
3.1.2) Efeito da suplementação com Pro na quantidade de comida ingerida	42
3.1.3) Efeito da administração de Pro no volume de bebida ingerido.....	43
3.1.4) Efeito da administração de Pro na excreção de urina	44
3.2) Efeito da administração de Pro na pressão arterial	45
3.3) Efeito da suplementação com Pro em marcadores urinários de stresse oxidativo....	46
3.3.1) Excreção urinária de H_2O_2 , isoprostanos e nitratos e nitritos	46
3.4) Efeito da suplementação com Pro na produção renal de H_2O_2 e na atividade de enzimas neutralizadoras de H_2O_2	48
3.4.1) Produção renal de H_2O_2 e atividade enzimática da catalase e GPx.....	48
4. DISCUSSÃO	50
5. CONCLUSÃO	55
6. BIBLIOGRAFIA	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Teoria do mosaico.....	14
Figura 2 - Sistema renina-angiotensina e principais efeitos no organismo.	27
Figura 3 - Mecanismos ativados pela Pro em resposta ao stresse oxidativo..	32
Figura 4 - Cronograma da atividade experimental.....	35
Figura 5 - Efeito da suplementação com Pro no peso corporal (g) de ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II, ao longo do tempo.....	42
Figura 6 - Efeito da suplementação com Pro na quantidade de comida ingerida em função do peso corporal (g/Kg), em ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II, ao longo do tempo.	43
Figura 7 - Efeito da suplementação com Pro no volume de bebida ingerido em função do peso corporal (mL/Kg), em ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II, ao longo do tempo.	44
Figura 8 - Efeito da suplementação com Pro na excreção urinária (mL/Kg/dia), em ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II. (A) dia 1, (B) dia 14 e (C) dia 21.	45
Figura 9 - Efeito da suplementação com Pro na pressão arterial sistólica (mmHg), de ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II.	45
Figura 10 - Efeito da suplementação com Pro na excreção urinária de (A) H_2O_2 ($\mu\text{mol/kg/dia}$), (B) isoprostanos (ng/Kg/24h) e (C) nitratos e nitritos ($\mu\text{mol/Kg/dia}$) no dia 1, em animais controlo (Sham) e tratados com Ang II.	46
Figura 11 - Efeito da suplementação com Pro na excreção urinária de (A) H_2O_2 ($\mu\text{mol/kg/dia}$), (B) isoprostanos (ng/Kg/24h) e (C) nitratos + nitritos ($\mu\text{mol/Kg/dia}$) no dia 14, em animais controlo (Sham) e tratados com Ang II.	47
Figura 12 - Efeito da suplementação com Pro na excreção urinária de (A) H_2O_2 ($\mu\text{mol/kg/dia}$), (B) isoprostanos (ng/Kg/24h) e (C) nitratos e nitritos ($\mu\text{mol/Kg/dia}$) no dia 21, em animais controlo (Sham) e tratados com Ang II.	48
Figura 13 - Efeito da suplementação com Pro na (A) produção de H_2O_2 (nmol/mg proteína), (B) atividade da catalase (U catalase/mg proteína) e (C) - atividade da GPx (nmol NADPH oxidado/min/mg proteína) na medula renal de ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II.	49

Figura 14 - Efeito da suplementação com Pro na (A) produção de H ₂ O ₂ (nmol/mg proteína), (B) atividade da catalase (U catalase/mg proteína) e (C) - atividade da GPx (nmol NADPH oxidado/min/mg proteína) no córtex renal de ratos controle (Sham) e tratados com Ang II.	50
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Definição e classificação da pressão arterial (em indivíduos maiores de 18 anos) (mmHg)	13
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Cínase específica para os aminoácidos serina/treonina, também designada de proteína cinase B (<i>Protein kinase B</i>)
Ang	Angiotensina
AT₁R	Recetor de tipo 1 da Ang II
AT₂R	Recetor de tipo 2 da Ang II
ATP	Adenosina trifosfato
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ECA 2	Enzima de conversão da angiotensina de tipo 2
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione (reduzida)
GSSG	Glutathione oxidada
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
HNO₂	Ácido nitroso
HO[•]	Radical hidroxilo
HOCl	Ácido hipocloroso
HSi	Hipertensão sistólica isolada
LOO[•]	Radical peroxilo lipídico
LOOH	Peróxidos lipídicos
MPO	Mieloperoxidase
mTOR	Proteína alvo da rapamicina nos mamíferos
N₂O₃	Trióxido de diazoto
NAD⁺	Forma oxidada do dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADH	Forma reduzida do dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Forma reduzida do dinucleótido fosfatado de nicotinamida e adenina
NF-κB	Fator de transcrição nuclear κB
NO[•]	Monóxido de azoto
NO₂[•]	Dióxido de azoto
NOS	Sintetases do NO [•] (<i>Nitric Oxide Synthases</i>)
Nox	NAD(P)H oxidases
O₂	Oxigénio

$^1\text{O}_2$	Oxigénio singleto
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
O_3	Ozono
ONOO^-	Peroxinitrito
P5C	pirrolina-5-carboxilato
POX	Prolina oxidase
Pro	L-prolina
PRODH	Prolina desidrogenase
redox	Oxidação/redução
RNS	Espécies reativas de azoto (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROO^\bullet	Radical peroxilo
ROS	Espécies reativas de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
s.c.	Infusão subcutânea
SOD	Superóxido dismutase
XDH	Xantina desidrogenase
XO	Xantina oxidase

1.INTRODUÇÃO

1.1) Hipertensão arterial

A hipertensão arterial é um grave problema de saúde pública (Badyal et al. 2003; Macedo et al. 2007), que afeta 30-45% da população europeia em geral (Mancia et al. 2013) e cerca de 40% da população adulta em Portugal (Macedo et al. 2007). A hipertensão é um dos principais fatores de risco para a insuficiência renal e para as doenças cardiovasculares, como o acidente vascular cerebral, o enfarte do miocárdio e a insuficiência cardíaca, que são causas frequentes de morbidade e mortalidade (Badyal et al. 2003; Macedo et al. 2007; Chobanian et al. 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde e a Sociedade Internacional de Hipertensão, considera-se que existe hipertensão arterial quando há uma elevação persistente da pressão arterial sistólica e/ou da pressão arterial diastólica para valores iguais ou superiores a 140 mmHg e 90 mmHg, respetivamente (**Tabela 1**) (Mancia et al. 2013).

Tabela 1 - Definição e classificação da pressão arterial (em indivíduos maiores de 18 anos) (mmHg)

Categoria	Pressão Sistólica		Pressão Diastólica
Ótima	<120	e	<80
Normal	120-129	e/ou	80-84
Normal alta	130-139	e/ou	85-89
Hipertensão grau 1 (ligeira)	140-159	e/ou	90-99
Hipertensão grau 2 (moderada)	160-179	e/ou	100-109
Hipertensão grau 3 (grave)	≥ 180	e/ou	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada (HSi) ¹	≥ 140	e	< 90

As categorias são definidas pelo maior valor de pressão arterial, quer seja sistólica ou diastólica. Quando as pressões arteriais sistólicas e diastólicas estão em diferentes categorias, considera-se a categoria do valor mais elevado.

Esta classificação é válida para adultos com idade igual ou superior a 18 anos, que não tomem fármacos anti-hipertensores e não apresentem nenhum processo patológico agudo concomitante (Direção-Geral da Saúde 2013).

1) A HSi classifica-se também em graus de 1 a 3, segundo os seus valores de pressão arterial sistólica (Direção-Geral da Saúde 2013).

Em condições em que a causa da hipertensão é desconhecida, esta é designada por hipertensão primária ou essencial. Quando é consequência de uma patologia identificável é designada por hipertensão secundária. Cerca de 95% dos casos de hipertensão são de hipertensão arterial primária pois apresentam uma etiologia multifatorial, fenómeno também designado por "Teoria do mosaico" (**figura 1**) (Page 1949), em que vários fatores genéticos, ambientais, anatómicos, adaptativos, neurais, endócrinos, humorais e hemodinâmicos interatuam no organismo causando o aumento do débito cardíaco e/ou da resistência vascular periférica e consequente elevação da pressão arterial (Harrison 2013). Nas últimas décadas foi evidenciado o envolvimento de mecanismos celulares e moleculares comuns, tais como a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, *Reactive Oxygen Species*) e a inflamação, em muitos dos componentes fisiopatológicos da Teoria do Mosaico. Sabe-se, por exemplo, que a disponibilidade biológica das ROS é influenciada por polimorfismos genéticos de enzimas pró-oxidantes e antioxidantes (Moreno et al. 2003), por poluentes ambientais (Xu et al. 2011), e situações de stresse. Alguns hábitos alimentares (e.g. consumo excessivo de sal) podem também aumentar a produção de ROS tóxicas e ativar células imunitárias, contribuindo para o desequilíbrio redox e processos inflamatórios (Hlebowicz et al. 2011; Marvar & Harrison 2012; Harrison 2013). A doença renal e a hiperatividade do sistema renina-angiotensina promovem igualmente um estado pró-oxidante com efeitos prejudiciais no sistema cardiovascular (Badyal 2003, Harrison 2013). A disfunção endotelial, a alteração da contractilidade dos vasos sanguíneos e a remodelação vascular são exemplos de consequências deletérias do excesso de ROS que contribuem para a hipertensão arterial e patologias cardiovasculares e renais associadas (Briones & Touyz 2010).

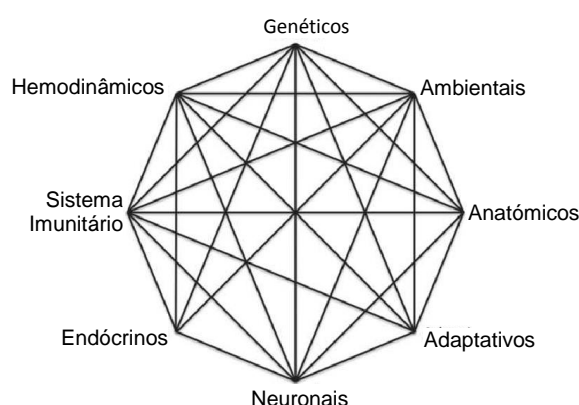


Figura 1 - Teoria do mosaico (fatores que podem causar hipertensão).

(Figura adaptada de Carey & Siragy 2003)

Apesar dos avanços obtidos na detecção, avaliação e terapêutica da hipertensão arterial, só uma pequena parte dos indivíduos hipertensos apresenta um controlo adequado da pressão arterial. Este facto deve-se não só à falta de adesão à terapêutica por parte do doente por se tratar de uma patologia assintomática, mas também à sua etiologia multifatorial que limita a eficácia dos tratamentos prescritos. Há portanto necessidade de melhorar a detecção, prevenção e o tratamento da hipertensão (Macedo et al. 2007; Sousa 2006) de modo a reduzir a morbilidade e mortalidade cardiovascular a ela associadas.

1.2) Stresse oxidativo e hipertensão arterial

O oxigénio (O_2) é um elemento indispensável à vida humana. É uma molécula essencial na cadeia respiratória mitocondrial, onde ocorre o principal mecanismo celular de obtenção de energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP). Neste processo, o O_2 é o aceitador final de eletrões e é reduzido a água (H_2O) (Storey 1996). Apesar da maior parte do O_2 ser utilizada pelo organismo neste processo de obtenção de energia, uma pequena parte é utilizada como substrato para outras enzimas (Storey 1996).

Quando as células utilizam o O_2 nos processos de oxidação/redução (redox) celulares, ocorre a formação de ROS. Estas são moléculas com elevada bioatividade e tempo de vida curto (Dröge 2002) que podem formar-se a partir do metabolismo, por reações enzimáticas e não enzimáticas, ou a partir de fontes externas, como por exemplo a poluição ou a radiação (Pham-Huy et al. 2008).

1.2.1) ROS

A família das ROS inclui muitas moléculas com efeitos distintos e que estão envolvidas em vários processos biológicos. Apesar de consideradas anteriormente como meros produtos do metabolismo celular, as ROS são atualmente reconhecidas como importantes moléculas reguladoras de diversas funções celulares (Dröge 2002; Briones & Touyz 2010), tais como o crescimento, diferenciação, sobrevivência, apoptose, expressão genética, reatividade vascular, homeostasia redox, imunidade e defesa contra micro-organismos (Dröge 2002; Briones & Touyz 2010; Sousa, Afonso, et al. 2012; Sugamura & Keaney 2011).

A família das ROS inclui os radicais livres de oxigénio, endógenos e exógenos, e as moléculas oxidantes não radicais (Pham-Huy et al. 2008).

Os radicais livres são moléculas com elevada reatividade devido à presença de um ou mais eletrões desemparelhados na camada de valência (Dröge 2002; Pham-Huy et al. 2008). São moléculas altamente instáveis que têm eletrões disponíveis para reagir com vários substratos como os lípidos, as proteínas e o ácido desoxirribonucleico (ADN) (Pham-Huy et al. 2008). Os radicais livres endógenos, ou biológicos, podem ser gerados em situações de stresse, exercício excessivo, isquemia, infeções, reações inflamatórias, durante o desenvolvimento do cancro e no processo de envelhecimento celular (Pham-Huy et al. 2008). Os radicais livres exógenos resultam da entrada de compostos no organismo, derivados de, por exemplo, poluição ambiental, álcool, metais (cádmio, mercúrio, chumbo, ferro e arsénio), solventes, radiação entre outros, que são decompostos ou metabolizados em radicais livres (Dröge 2002; Pham-Huy et al. 2008). A família de radicais livres de oxigénio inclui: o radical hidroxilo (HO^\bullet), o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o radical peróxilo (ROO^\bullet) e o radical peróxilo lipídico (LOO^\bullet) (Pham-Huy et al. 2008). As moléculas oxidantes não radicais têm maior estabilidade e uma reatividade mais específica, comparativamente com os radicais livres. Entre estas moléculas incluem-se: o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o ozono (O_3), o oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$), o ácido hipocloroso (HOCl), e os peróxidos lipídicos (LOOH) (Pham-Huy et al. 2008; Sousa, Afonso, et al. 2012). Além das ROS, existe ainda outra família de moléculas oxidantes que exercem também importantes funções fisiológicas e patológicas e que se designam no seu conjunto por espécies reativas de azoto (RNS, *Reactive Nitrogen Species*). Estas podem também ser radicais livres como o monóxido de azoto (NO^\bullet), o dióxido de azoto ($\text{NO}_2^{\bullet-}$) e espécies não radicais como o ácido nitroso (HNO_2), o peroxinitrito (ONOO^-), o trióxido de diazoto (N_2O_3).

Alguns sistemas endócrinos e fatores do sistema imunitário podem ativar enzimas produtoras de ROS. As ROS promovem a vasoconstrição, aumentam a hipertrofia vascular do músculo liso e induzem a apoptose de células endoteliais. Estes efeitos promovem a elevação da pressão arterial e provocam lesões nos órgãos (Harrison 2013).

1.2.2) Fontes de ROS

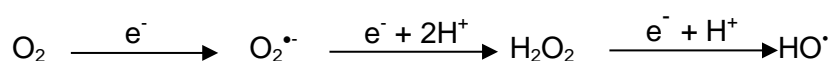
Como mencionado anteriormente, as espécies reativas podem formar-se a partir de moléculas endógenas ou exógenas. No organismo, algumas das mais importantes fontes de espécies reativas são as enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, as

oxidases da forma reduzida do dinucleótido fosfatado de nicotinamida e adenina (NADPH) e da forma reduzida do dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH), também designadas como NAD(P)H oxidases, a xantina oxidoreductase, as sintetases do NO[•] e a mieloperoxidase (Datla & Griendling 2010; Sugamura & Keaney 2011; Addabbo et al. 2009; Brown & Griendling 2009). Existem ainda outros sistemas pró-oxidantes que contribuem para a produção de ROS, tais como as enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico (ciclooxigenase e lipoxigenase), as isoenzimas do citocromo P450 e as enzimas envolvidas na oxidação de aminas (Wassmann et al. 2004)

1.2.2.1) Enzimas da cadeia respiratória mitocondrial

As enzimas da cadeia respiratória mitocondrial são a principal fonte intracelular de ROS (Sugamura & Keaney 2011; Sousa, Afonso, et al. 2012). A principal função desta cadeia respiratória é a produção de ATP, com a redução do O₂ a H₂O. No entanto, durante as reações da cadeia respiratória mitocondrial, o O₂ pode ser convertido no radical O₂^{•-}, que pode ser convertido em H₂O₂, e este por sua vez pode ser convertido em HO[•] (**Reação 1**) (Addabbo et al. 2009; Sugamura & Keaney 2011). Estas ROS podem ser prejudiciais para as funções mitocondriais se não forem neutralizadas apropriadamente (Addabbo et al. 2009; Sugamura & Keaney 2011). Há evidência de que os animais hipertensos têm uma maior produção mitocondrial de ROS nos vasos, rins e sistema nervoso central (Sugamura & Keaney 2011).

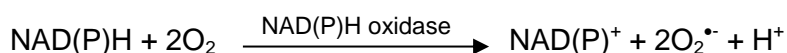
Reação 1:



1.2.2.2) NAD(P)H oxidases

As NAD(P)H oxidases (Nox) são uma família de complexos enzimáticos que catalisam a redução do O₂ em O₂^{•-}, usando o NADPH como fonte de elétrons (**Reação 2**) (Bedard & Krause 2007). A sua principal função é produzir ROS (Briones & Touyz 2010), sendo a principal fonte de O₂^{•-} nas células vasculares e cardíacas (Griendling et al. 2000). As Nox também transferem elétrons através das membranas biológicas (Briones & Touyz 2010).

Reação 2:



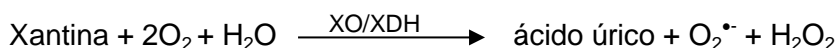
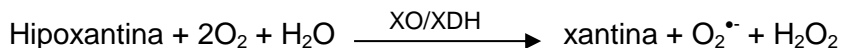
Esta família tem um total de 7 isoformas que são expressas de uma maneira tecidual específica (por exemplo, estão presentes em células fagocitárias, células vasculares endoteliais, células do músculo liso vascular, fibroblastos e cardiomiócitos) (Bedard & Krause 2007).

As isoformas Nox 1, 2 e 4 são expressas nos principais locais de controlo da pressão sanguínea (Datla & Griendling 2010), como por exemplo o tecido vascular, e são, provavelmente, a principal fonte de ROS no sistema cardiovascular (Briones & Touyz 2010). Estas isoformas desempenham funções importantes na fisiopatologia da hipertensão (Datla & Griendling 2010; Bedard & Krause 2007). As ROS produzidas pelas Nox influenciam a função vascular através de vários mecanismos, como por exemplo a indução de respostas inflamatórias e a fibrose (Briones & Touyz 2010). As isoformas Nox 2 e 4 participam na regulação das funções renais e contribuem para lesões de órgãos causadas pela hipertensão (Datla & Griendling 2010; Nistala et al. 2008). Nos vasos sanguíneos, a Nox 1 controla o crescimento e a migração das células do músculo liso vascular, a Nox 2 contribui para a disfunção endotelial e a Nox 4 controla a diferenciação das células do músculo liso vascular e aumenta a vasodilatação dependente do endotélio (Datla & Griendling 2010; Brown & Griendling 2009). As Nox vasculares podem ser reguladas por peptídeos vasoativos, como a angiotensina (Ang) II (Briones & Touyz 2010).

1.2.2.3) Xantina oxidoreductase

A xantina oxidoreductase tem 2 formas interconvertíveis: a xantina desidrogenase (XDH) e a xantina oxidase (XO) (Berry & Hare 2004; Pacher et al. 2006), que estão amplamente distribuídas no organismo e participam no metabolismo das purinas (Sugamura & Keaney 2011). Estas enzimas catalisam a conversão da hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico (**Reação 3**) (Berry & Hare 2004; Pacher et al. 2006). Como consequência associada a esta reação, ocorre a redução de O_2 em $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Berry & Hare 2004).

Reação 3:



A isoforma XDH utiliza a forma oxidada do dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD^+) como aceitador de elétrons e a isoforma XO utiliza o O_2 como substrato. Por este motivo, a quantidade de $\text{O}_2^{\bullet-}$ produzido pela XO é maior que a quantidade produzida pela XDH (Berry & Hare 2004).

Esta enzima existe tipicamente na isoforma de XDH, mas em condições de stresse oxidativo predomina a isoforma XO (Pacher et al. 2006; Houston et al. 1999). Uma elevada atividade da enzima XO contribui para o aumento da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Este fenómeno pode contribuir para a disfunção endotelial e para a hipertensão (Briones & Touyz 2010; Pacher et al. 2006; Houston et al. 1999). A XO pode ainda causar danos nos órgãos, durante a hipertensão (Briones & Touyz 2010).

1.2.2.4) Sintetases do NO^{\bullet}

As sintetases do NO^{\bullet} (NOS, *Nitric Oxide Synthases*) constituem uma família de isoformas enzimáticas que produzem NO^{\bullet} , numa reação que converte arginina em citrulina (Sugamura & Keaney 2011; Vásquez-Vivar et al. 1998). No entanto, em condições de stresse oxidativo e/ou de limitada disponibilidade do cofator tetrahidrobiopterina ou do substrato arginina, estas enzimas tornam-se instáveis, ficam desacopladas e transferem os elétrons para o O_2 , reduzindo-o a $\text{O}_2^{\bullet-}$, em vez de produzirem NO^{\bullet} (Sugamura & Keaney 2011; Vásquez-Vivar et al. 1998). Há 3 isoformas de NOS: as NOS neuronais, as NOS endoteliais e as NOS indutíveis (Sugamura & Keaney 2011).

As NOS endoteliais produzem NO^{\bullet} que induz a vasodilatação. O fenómeno de desagregação das NOS é sensível às alterações do ambiente redox, sendo a separação destas enzimas promovida pelo stresse oxidativo (Briones & Touyz 2010). Vários estudos experimentais demonstraram que a hipertensão arterial está associada à desregulação de NOS endoteliais e consequente disfunção endotelial (Sousa, Afonso, et al. 2012).

1.2.2.5) Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma proteína heme secretada por neutrófilos e monócitos ativados. Em condições inflamatórias, produz várias moléculas oxidantes que podem afetar e alterar lípidos e proteínas (Sugamura & Keaney 2011; Wassmann et al. 2004). A MPO pode utilizar o H_2O_2 para produzir outras moléculas oxidantes, tais como o HOCl, RNS e nitrotirosina (Wassmann et al. 2004; Malle et al. 2003; Sugamura & Keaney 2011). As ROS derivadas da MPO causam dano tecidual no coração, vasos, rins e cérebro e parecem contribuir para a disfunção endotelial (Malle et al. 2003).

1.2.3) Defesas antioxidantes

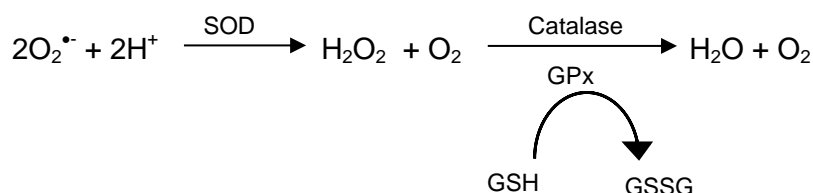
O organismo desenvolveu mecanismos de adaptação e de defesa contra os efeitos nocivos das ROS através da produção de antioxidantes. Um antioxidante é qualquer substância que em baixas concentrações é capaz de atrasar ou inibir significativamente a oxidação de um substrato oxidável. A sua função é neutralizar os efeitos tóxicos do excesso de radicais livres, protegendo as células (Pham-Huy et al. 2008; Guzik et al. 2003; Haddad 2002). A diminuição da disponibilidade de ROS causada pelos antioxidantes contribui para a melhoria da imunidade do organismo e para a prevenção de patologias (Pham-Huy et al. 2008). Todas as células eucarióticas possuem potentes enzimas antioxidantes que são responsáveis por neutralizar as ROS. Os antioxidantes podem ser produzidos naturalmente pelo organismo (endógenos) ou obtidos através da dieta ou suplementos (exógenos). Os antioxidantes podem ser caracterizados como antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos. A redução da disponibilidade endógena de antioxidantes quebra a homeostasia redox deixando os organismos mais vulneráveis ao dano oxidativo (Sousa, Afonso, et al. 2012).

1.2.3.1) Defesas antioxidantes enzimáticas

Existem enzimas capazes de neutralizar as ROS (Guzik et al. 2003; Haddad 2002), como por exemplo a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx). Estas enzimas são, por exemplo, ativadas no processo de dismutação do $O_2^{\bullet-}$. Este radical é convertido em H_2O_2 pelas isoformas da enzima SOD presentes no

citosol, organelos, mitocôndria e fluidos extracelulares (Wassmann et al. 2004; Young & Woodside 2001). O H_2O_2 gerado nesta reação pode ser depois decomposto em H_2O e O_2 . Esta última reação pode ocorrer pela ação da catalase, nos peroxissomas, ou da GPx, no citosol e mitocôndria (**Reação 4**) (Young & Woodside 2001).

Reação 4:



A enzima SOD é considerada como uma primeira linha de defesa antioxidante contra as ROS devido à sua ação sobre o $\text{O}_2^{\bullet-}$. Desta forma, a atividade da SOD reduz o stresse oxidativo e melhora o equilíbrio redox do organismo (Majzunova et al. 2013).

A catalase, através da reação acima descrita, protege as células contra os efeitos nocivos do H_2O_2 . Esta enzima é requerida em situações de stresse oxidativo marcado em que há necessidade de remover elevadas concentrações de H_2O_2 (Wassmann et al. 2004).

A atividade da GPx depende da disponibilidade de glutathiona (GSH) (Young & Woodside 2001). Para além de neutralizar o H_2O_2 , a GPx também degrada os peróxidos lipídicos em álcoois lipídicos (Wassmann et al. 2004). Nestas reações, o substrato da enzima é a GSH, ocorrendo a sua oxidação a glutathiona oxidada (GSSG) (Wassmann et al. 2004).

1.2.3.2) Defesas antioxidantes não enzimáticas

Existem também outras moléculas não enzimáticas, como o ácido úrico, a GSH, o ácido ascórbico, o α -tocoferol (vitamina E) e o β -caroteno, que são capazes de proteger o organismo contra as ROS (Storey 1996). O ácido úrico é muito abundante e é considerado o principal contribuidor para a capacidade antioxidante do plasma (Waring 2002). O ácido úrico tem a capacidade de sequestrar o HO^{\bullet} e o ONOO^- e pode prevenir a peroxidação lipídica (Waring 2002). O ácido úrico também atua como um quelante do ferro nos fluidos extracelulares (Pacher et al. 2006). No entanto, uma vez dentro das células, o ácido úrico parece exercer efeitos pró-oxidantes (Sousa, Afonso, et al. 2012). A GSH é uma molécula muito importante na defesa antioxidante, capaz de sequestrar ROS,

regenerar a vitamina E e reativar enzimas que tenham sido inibidas sob condições oxidantes. A GSH encontra-se nas células em elevadas concentrações, sendo muito provável que exerça estes efeitos antioxidantes (Storey 1996). As restantes moléculas acima referidas têm a capacidade de interromper a propagação autocatalítica das reações mediadas pelos radicais livres (Storey 1996).

1.2.4) Stresse oxidativo e hipertensão arterial

As ROS podem exercer efeitos benéficos ou tóxicos, consoante a sua concentração (Dröge 2002; Young & Woodside 2001). Em condições fisiológicas, as ROS existem em baixa concentração possibilitando a existência de processos de sinalização redox que regulam funções celulares (Dröge 2002; Young & Woodside 2001). Pelo contrário, uma elevada concentração de ROS, resultante de uma quebra na homeostasia redox, exerce toxicidade no organismo, impossibilitando o normal funcionamento celular e podendo levar a situações patológicas (Dröge 2002; Young & Woodside 2001; Phang et al. 2010; Liang et al. 2013).

A disponibilidade endógena de ROS é determinada pelo balanço entre a sua produção por moléculas oxidantes e a sua eliminação por vários compostos e enzimas antioxidantes (Dröge 2002). Em condições patológicas ocorre um desequilíbrio entre a formação e a neutralização de ROS (Pham-Huy et al. 2008; Touyz 2003), determinando o aumento excessivo da concentração de ROS no organismo. Este fenómeno, vulgarmente designado por stresse oxidativo (Briones & Touyz 2010; Touyz 2003), é potencialmente prejudicial podendo levar a danos de macromoléculas biológicas, incluindo lípidos, proteínas, hidratos de carbono e ADN, e à disrupção da sinalização redox (Dröge 2002; Young & Woodside 2001). O stresse oxidativo parece estar na génese de uma variedade de doenças crónicas e degenerativas, sendo um dos principais contribuidores para o desenvolvimento e progressão de patologias cardiovasculares (Pham-Huy et al. 2008; Touyz 2003; Sousa et al. 2008). Há uma relação entre o desenvolvimento da hipertensão e o desequilíbrio redox. O excesso de ROS promove alterações da estrutura e função vascular, renal e cardíaca por influenciar o crescimento celular, a contração e dilatação vascular e respostas inflamatórias (Datla & Griendling 2010; Briones & Touyz 2010). Estas alterações são mediadas por vias de sinalização dependentes do estado redox do organismo (Briones & Touyz 2010) e por outros mecanismos como a inativação do vasodilatador NO^* pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Guzik et al. 2003; Briones & Touyz 2010), a formação de produtos vasoconstritores resultantes da peroxidação lipídica (ex: isoprostanos), a

ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios, a estimulação da produção de fatores de crescimento e a indução de fibrose através da ativação das metaloproteinases da matriz (Briones & Touyz 2010).

Apesar de vários estudos terem evidenciado o aumento do stresse oxidativo na hipertensão experimental e humana (Sousa, Afonso, et al. 2012), continua ainda por esclarecer se o stresse oxidativo é uma causa ou consequência da hipertensão arterial (Harrison 2013; Sousa, Afonso, et al. 2012). A hipótese de que o stresse oxidativo promove a hipertensão arterial é suportada por várias linhas de evidência: (1) a indução de stresse oxidativo pelo chumbo, ou por inibidores da SOD ou da síntese da GSH, aumenta a pressão arterial nos ratos; (2) a infusão de H_2O_2 na medula renal determina hipertensão; (3) o tratamento de animais hipertensos com antioxidantes ou inibidores da produção de ROS previne ou atenua a hipertensão; (3) a manipulação de genes relacionados com a produção ou eliminação de ROS pode alterar a pressão sanguínea; (4) a exposição *in vitro* de células e tecidos a oxidantes exógenos reproduz eventos envolvidos na fisiopatologia da hipertensão; (5) a disfunção redox sistémica e tecidular parece preceder a elevação da pressão sanguínea (Sousa, Afonso, et al. 2012; Briones & Touyz 2010; Sousa et al. 2008). São argumentos de que o stresse oxidativo é uma consequência da hipertensão arterial o facto de as forças mecânicas de tensão e estiramento vascular presentes na hipertensão arterial induzirem o stresse oxidativo e a lesão vascular, e o facto de a diminuição da pressão sanguínea *per se* reduzir o stresse oxidativo e melhorar a função endotelial (Paravicini & Touyz 2006; Sousa, Afonso, et al. 2012). É provável que exista um mecanismo de amplificação pelo qual o stresse oxidativo aumenta a disfunção cardiovascular e renal (Datla & Griendling 2010; Cai 2005), induzindo a elevação da pressão arterial, o que por sua vez promove uma maior produção de ROS e um maior dano oxidativo (Briones & Touyz 2010).

1.2.5) Hipertensão causada por diferentes ROS

A produção de ROS envolve geralmente numa cascata de reações. Por exemplo, quando há formação de $O_2^{\bullet-}$, este pode ser rapidamente transformado em H_2O_2 , quer seja espontaneamente ou por um processo catalisado pela SOD (Briones & Touyz 2010).

O $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 têm sido reconhecidos como as principais ROS biológicas envolvidas na sinalização de processos fisiológicos e patológicos (Paravicini & Touyz 2006; Ardanaz & Pagano 2006). Tem sido atribuído um papel central ao $O_2^{\bullet-}$ na patogénese da hipertensão, uma vez que ele reduz disponibilidade de NO^* , causando

disfunção endotelial (Sousa et al. 2008). No entanto, o H_2O_2 parece ter também um papel fundamental na gênese e progressão da hipertensão arterial (Sousa et al. 2008). Estas duas ROS parecem ser de grande importância nos sistemas cardiovascular e renal e no controle neuronal, renal e vascular da pressão arterial (Ardanaz & Pagano 2006; Datla & Griendling 2010; Touyz 2003).

O radical O_2^{\bullet} tem um tempo de vida biológico relativamente curto e a sua carga impede que atravesse membranas, exceto, através de canais iônicos. Assim, é mais difícil que produza efeitos em locais distantes de onde foi produzido (Ardanaz & Pagano 2006).

Em contraste, o H_2O_2 , como não tem um elétron desemparelhado, é uma molécula mais estável e com maior tempo de vida. Além disso, difunde-se facilmente pelas bicamadas lipídicas (Ardanaz & Pagano 2006). Por estas razões, o H_2O_2 parece ser mais prejudicial do que o O_2^{\bullet} (Cai 2005; Ardanaz & Pagano 2006). É de sublinhar que a conversão de O_2^{\bullet} em H_2O_2 parece estar favorecida em doenças cardiovasculares, uma vez que a expressão e atividade da SOD são aumentadas pelas citocinas inflamatórias na hipertensão ou em resposta à Ang II (Ardanaz & Pagano 2006; Sousa, Afonso, et al. 2012).

Há evidência crescente de que o H_2O_2 é um mediador parácrino da disfunção cardiovascular e renal (Ardanaz & Pagano 2006). Têm sido descritos diversos efeitos pró-hipertensivos do H_2O_2 , tais como o aumento da vasoconstrição, a hipertrofia e hiperplasia vascular (Sousa et al. 2008; Ardanaz & Pagano 2006; Touyz 2003; Cai 2005) e o decréscimo de diurese e natriurese (Sousa et al. 2008; Ardanaz & Pagano 2006). O H_2O_2 parece ser ainda uma molécula mediadora chave, sendo capaz de aumentar a ativação do sistema renina-angiotensina intra-renal que é um importante regulador da pressão sanguínea e da função renal (Sousa, Oliveira, et al. 2012). É ainda de sublinhar que o H_2O_2 propaga a sua própria produção e amplifica o stresse oxidativo por estimulação da formação de ROS pelas Nox, XO e NOS endoteliais (Cai 2005; Ardanaz & Pagano 2006). Este efeito amplificador poderá prolongar as alterações da estrutura vascular induzidas pelo H_2O_2 (Sousa et al. 2008).

Em doentes hipertensos, há evidência quer do aumento da produção de O_2^{\bullet} por leucócitos polimorfonucleares, quer da elevação da produção plasmática de H_2O_2 (Kristal et al. 1998). É ainda de notar que os indivíduos normotensos com uma história familiar de hipertensão apresentam uma maior produção de H_2O_2 do que os restantes normotensos (Lacy et al. 1998; Lacy et al. 2000).

1.3) Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina é um dos principais sistemas hormonais responsáveis por regular a pressão sanguínea e a homeostasia de fluidos e eletrólitos (Griendling et al. 1993; M. Peach 1977), controlando a função cardiovascular, renal e supra-renal. Este sistema é constituído por 5 elementos principais: 1) angiotensinogénio, 2) renina, 3) enzima conversora da angiotensina (ECA), 4) Ang II e 5) recetor de tipo 1 da Ang II (AT₁R).

O angiotensinogénio é uma glicoproteína sintetizada, principalmente, no fígado, mas pode também ser sintetizada no coração, sistema vascular, rins e tecido adiposo. O seu principal reservatório é o plasma. É o principal substrato da enzima renina e é a molécula precursora da Ang (Griendling et al. 1993; Carey & Siragy 2003).

A renina é uma enzima proteolítica de grande especificidade para o seu substrato, o angiotensinogénio. A renina catalisa a conversão do angiotensinogénio em Ang I (Griendling et al. 1993; Lindpaintner & Ganten 1991; Carey & Siragy 2003). A maior fonte de síntese de renina são as células justaglomerulares renais (Griendling et al. 1993; M. Peach 1977). A renina é secretada diretamente para o lúmen da arteríola aferente e para o espaço intersticial (Levens et al. 1981).

A ECA é uma peptidase que converte o decapeptídeo inativo Ang I no octapeptídeo biologicamente ativo Ang II (Griendling et al. 1993; Lindpaintner & Ganten 1991). A ECA quebra os dipeptídeos terminais. A seletividade da enzima é orientada pelo terminal carboxilo do seu substrato e está presente em quase todos os tecidos e fluidos corporais (Lindpaintner & Ganten 1991; Griendling et al. 1993).

A Ang II é o principal produto resultante da cascata de reações enzimáticas do sistema renina-angiotensina. A Ang II é um potente vasoconstritor (Griendling et al. 1993; Levens et al. 1981), capaz de regular a expressão do seu precursor, o angiotensinogénio, e a atividade da ECA (Griendling et al. 1993). A Ang II pode influenciar a função renal sob condições de restrição de sódio e H₂O (Levens et al. 1981). A Ang II exerce uma ação dual, dependente da dose, na reabsorção de sódio que é feita através dos túbulos renais. Após administração de doses elevadas de Ang II, a natriurese aumenta, enquanto doses baixas resultam na retenção de sódio (Levens et al. 1981). Ao contrário da renina e do angiotensinogénio, que têm um tempo de semi-vida relativamente longo no plasma, a Ang II é degradada em segundos pelas peptidases angiotensinas, em diferentes locais aminoacídicos para formar fragmentos (Carey & Siragy 2003).

A etapa final desta cascata é a ligação da Ang II com o AT₁R (M. J. Peach 1977; Unger 2002). O AT₁R está localizado na membrana celular e é o responsável pela

transdução dos efeitos fisiológicos cardiovasculares e renais da Ang II (Unger 2002; M. Peach 1977; Griendling et al. 1993), como a vasoconstrição, a proliferação celular, a retenção de sódio nos rins e a libertação de aldosterona (Hernandez Schulman et al. 2007).

Além deste recetor, foram identificados quatro tipos diferentes de recetores de Ang. Os recetores de tipo 2 da Ang II (AT₂R) são abundantes em vários tecidos durante o período fetal, mas o seu número diminui após o nascimento. A ativação destes recetores produz efeitos contrários aos do AT₁R, como a vasodilatação, inibição do crescimento celular (fibroblastos, endotélio, miócitos), a melhoria da função cardíaca e diminuição da reabsorção de sódio no tubo proximal (Giestas et al. 2010).

Para além da Ang II, o sistema renina-angiotensina tem um heptapeptídeo biologicamente ativo, a Ang (1-7) que é produzida, sobretudo, pela ação enzima de conversão da angiotensina de tipo 2 (ECA 2), uma enzima homóloga à ECA, que tem grande afinidade para a Ang II. Assim, a Ang II é o principal substrato para a síntese da Ang (1-7). Esta peptídeo pode também ser produzido, mas menos eficientemente, a partir da hidrólise de Ang I (Simões e Silva et al. 2013). A Ang (1-7) exerce no organismo funções opostas às que são atribuídas à Ang II (Paul et al. 2006). Assim, a Ang (1-7) é considerada um membro biologicamente ativo do sistema renina-angiotensina, que se liga aos recetores Mas, induzindo muitas ações benéficas, como a vasodilatação, a inibição do crescimento das células, efeitos antitrombóticos e antiarritmogénicos (Simões e Silva et al. 2013).

O sistema renina-angiotensina é então constituído por uma cascata de reações enzimáticas que tem como resultado final a formação de Ang II a partir do angiotensinogénio (**figura 2**). A maior parte da Ang II é formada em 2 etapas: primeiro o angiotensinogénio sofre ação da enzima renina que catalisa a sua conversão no decapeptídeo Ang I; esta, por sua vez, é hidrolisada pela ECA e forma a Ang II (Carey & Siragy 2003; Johnston & Risvanis 1997). A Ang II é a principal molécula efetora deste sistema e pode atuar como uma hormona sistémica (endócrina) ou como um fator gerado localmente (parácrino, autocrino) (Johnston & Risvanis 1997). A etapa final desta cascata é a ligação da Ang II ao AT₁R. Os efeitos fisiológicos cardiovasculares e renais da Ang II são mediados através da ligação da Ang II ao AT₁R (Unger 2002; M. Peach 1977).

O sistema renina-angiotensina e a Ang II estão no centro de vários processos fisiopatológicos e a ativação crónica deste sistema tem sido referida como um dos principais fatores que contribuem para a progressiva disfunção dos órgãos-alvo (Unger 2002).

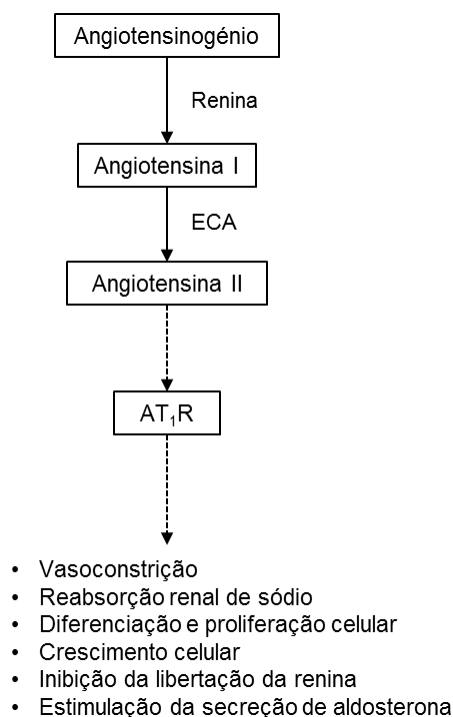


Figura 2 - Sistema renina-angiotensina e principais efeitos no organismo.

(Figura adaptada de Carey & Siragy 2003)

ECA – enzima conversora da angiotensina; AT₁R - recetor de tipo 1 da Ang II

O sistema renina-angiotensina clássico é considerado um sistema sistémico (Griendling et al. 1993), em que as moléculas biologicamente ativas, são excretadas a partir de uma determinada glândula para atingir os seus tecidos alvo, através da corrente sanguínea (Lindpaintner & Ganten 1991). No entanto, com base em estudos moleculares e bioquímicos, houve uma evolução no conhecimento deste sistema, considerando-se, atualmente, a existência de sistemas renina-angiotensina locais com diferentes mecanismos de regulação (Danser & Saris 2002; Bader et al. 2001). Tem sido proposto que existe um sistema renina-angiotensina local nos vasos sanguíneos, no cérebro, no coração, no rim, no sistema nervoso, na pele, entre outros locais (Griendling et al. 1993; Paul et al. 2006). Estes sistemas podem funcionar como mecanismos para limitar as ações da Ang II num órgão específico ou num evento fisiológico específico (Griendling et al. 1993).

1.3.1) Ang II, hipertensão e H₂O₂

A Ang II tem efeitos na pressão sanguínea e na osmorregulação. Esta molécula induz a vasoconstrição, a liberação de aldosterona, vasopressina e catecolaminas e a

reabsorção renal tubular de sódio, levando a um aumento na pressão sanguínea (M. Peach 1977; Unger 2002). A Ang II é sensível aos efeitos de *feedback* positivo/negativo na zona tubuloglomerular renal (Carey & Siragy 2003).

A influência de Ang II na reabsorção de sódio é amplificada pelas suas ações sinérgicas na estrutura vascular e túbulos renais. A Ang II induz a constrição das arteríolas e estimula a contração das células mesangiais, levando à redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular. Adicionalmente, a Ang II decresce o fluxo sanguíneo medular, aumentando assim a reabsorção passiva de sódio na ansa de Henle. A diminuição da concentração de sódio vai estimular uma maior libertação de renina para a circulação sistémica. Como resultado desta produção periférica de Ang II, a aldosterona é secretada do córtex supra-renal e estimula a recaptação de sódio no túbulo distal. Além disso, a elevação da concentração sistémica de Ang II vai reforçar os efeitos vasoconstritores intrarenais da Ang produzida no rim e estimula a libertação de vasopressina da glândula pituitária (Levens et al. 1981). O efeito final das ações renais vasculares e tubulares da Ang II é a diminuição da excreção de sódio (Carey & Siragy 2003), e consequente aumento da pressão arterial. Adicionalmente, a Ang II aumenta a rigidez da parede vascular, prejudicando assim a capacidade de distensão (*compliance*) vascular (Maraj et al. 2013).

A ativação intra-renal do sistema renina-angiotensina desempenha um papel importante no desenvolvimento da hipertensão e do dano renal (Sousa, Oliveira, et al. 2012). A Ang II estimula a produção intra-renal de angiotensinogénio através da ativação do AT₁R, contribuindo para elevadas concentrações de Ang II no rim (Kobori et al. 2004). Este mecanismo amplifica os efeitos deletérios de Ang II na função renal e contribui para a progressão da hipertensão (Sousa, Oliveira, et al. 2012). A desregulação da sinalização da Ang II no sistema nervoso central e nos rins está também implicada no desenvolvimento da hipertensão (Briones & Touyz 2010).

Para além das suas funções como constituinte do sistema renina-angiotensina, a Ang II é também o principal estímulo para a ativação ou aumento da expressão das enzimas pró-oxidantes Nox, contribuindo para o stresse oxidativo (Paravicini & Touyz 2006; Briones & Touyz 2010). A estimulação da produção vascular, renal, cardíaca e neuronal de ROS (Briones & Touyz 2010), é um importante mecanismo na fisiopatologia da hipertensão induzida pela Ang II.

As ROS, como o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 , são reconhecidas como importantes mediadores dos efeitos fisiológicos e patológicos da Ang II. Sabe-se, por exemplo, que indivíduos hipertensos exibem maior concentração plasmática de H_2O_2 que se correlaciona diretamente com um aumento da atividade do sistema renina-angiotensina e disfunção de

órgãos alvos (Lacy et al. 1998; Lacy et al. 2000). O H_2O_2 é um fator chave na amplificação dos efeitos da Ang II. Ele ativa o fator de transcrição nuclear κB (NF- κB), que regula a expressão de vários genes envolvidos na homeostasia do sódio e no controlo da pressão sanguínea, incluindo o gene do angiotensinogénio (Brasier et al. 2000) e aumenta a expressão de enzimas pró-oxidantes (Echeverri & Mockus 2008). A medula renal é um dos principais alvos da disfunção redox induzida pela Ang II (Sousa, Oliveira, et al. 2012). Os ratos com hipertensão arterial dependente da Ang II apresentam uma elevação significativa de H_2O_2 nas artérias, medula renal, plasma e urina (Sousa et al. 2008; Sousa, Oliveira, et al. 2012). Além disso, exibem um aumento da ativação do NF- κB , bem como uma expressão aumentada da Nox4 e do AT_1R na medula renal. Apresentam ainda um aumento da excreção urinária de angiotensinogénio (Sousa et al. 2008; Sousa, Oliveira, et al. 2012).

O aumento da expressão da catalase, uma enzima neutralizadora de H_2O_2 , ou a administração prolongada desta enzima reduzem a resposta pressora à Ang II (Yang & Shi 2003; Sousa, Oliveira, et al. 2012). No entanto, o tratamento prolongado com catalase tem uma eficácia anti-hipertensora de curta duração, o que se deve provavelmente à ativação de mecanismos contra-reguladores (Sousa, Oliveira, et al. 2012). Por esse motivo, torna-se necessário encontrar melhores estratégias antioxidantes para prevenir o aumento patológico de H_2O_2 .

1.4) Prolina

A L-prolina (Pro) é um aminoácido (AA) proteinogénico com especial interesse devido às diferentes características que apresenta em comparação com outros AAs proteinogénicos (Wu 2009). A Pro contribui para a estabilidade física das proteínas e para as propriedades bioquímicas e físicas que estas conferem aos tecidos e órgãos (Phang et al. 2008; Phang et al. 2010). É também considerada um AA não essencial para os mamíferos, pois é produzida pelo organismo nas quantidades necessárias ao seu funcionamento normal. De facto, a Pro é um dos AAs mais abundantes na estrutura do colagénio e nas proteínas do leite dos mamíferos (Wu et al. 2011; Wyse & Netto 2011). Esta molécula é também um AA funcional devido às suas funções na regulação da bioquímica celular (Wu 2009; Wu et al. 2011). A Pro tem várias funções nos processos bioquímicos e fisiológicos dos organismos. Este AA funcional pode atuar como molécula sinalizadora e antioxidante regulando vias metabólicas, vias de defesa e vias de proliferação e sobrevivência, sendo ainda um dos constituintes principais do colagénio

nos animais. A Pro desempenha também um papel importante na estrutura e metabolismo de proteínas (Phang et al. 2008; Wu 2009; Wu et al. 2011). Deste modo, a Pro contribui para a homeostasia do organismo. A Pro é uma molécula muito versátil e importante para o metabolismo primário (Phang et al. 2008; Wu 2009; Szabados & Savouré 2010).

A Pro é sintetizada e metabolizada nas células por uma família de enzimas específicas com localizações subcelulares e mecanismos de regulação específicos, o que permite à Pro responder a diferentes exigências bioenergéticas, como por exemplo, atuar em diferentes situações de stresse e participar na sinalização metabólica (Phang et al. 2008). A Pro é disponibilizada ao organismo através da sua biossíntese endógena a partir do glutamato e da ornitina ou pela reciclagem de AAs resultantes da proteólise (Adams & Frank 1980; Wu et al. 2011). A Pro é metabolizada pela enzima prolina oxidase (POX), também designada de prolina desidrogenase (PRODH) (Wu 2009; Wu et al. 2011), produzindo eletrões que podem ser utilizados para reduzir diretamente o O_2 , produzindo ROS, como o O_2^{\bullet} e o H_2O_2 que induzem vários mecanismos como o bloqueio do ciclo celular e a apoptose (Phang et al. 2001; Phang et al. 2008; Phang et al. 2010; Wyse & Netto 2011).

Apesar do metabolismo da Pro ocorrer em ambiente celular, existem vários processos bioquímicos e fisiológicos regulados pela Pro e seus produtos (Phang et al. 2001; Phang et al. 2010).

1.4.1) Prolina e stresse oxidativo

A Pro tem um papel biológico fundamental na resposta ao stresse, sendo utilizada por vários organismos para compensar desequilíbrios celulares causados pelo stresse oxidativo, ambiental e nutricional (Rodriguez & Redman 2005; Liang et al. 2013). É sabido que concentrações elevadas de ROS causam danos intracelulares, contribuindo para mecanismos patológicos. A Pro tem a capacidade de proteger as células contra o stresse oxidativo através de mecanismos moleculares que resultam das suas propriedades químicas e dos seus efeitos nos sistemas redox, sendo considerada um potente antioxidante (Phang et al. 2010; Liang et al. 2013). Como a produção de ROS é um fenómeno comum a vários tipos de stresses, a Pro tem assim a capacidade de proteger o organismo contra vários tipos de agressões e não apenas as de carácter oxidativo (Rodriguez & Redman 2005; Krishnan et al. 2008; Natarajan et al. 2012).

Uma das propriedades da Pro, muito importante na proteção contra o stresse oxidativo, é a capacidade deste AA de sequestrar ROS, diminuindo assim os seus efeitos prejudiciais (Rodriguez & Redman 2005; Krishnan et al. 2008; Natarajan et al. 2012). Esta propriedade da Pro foi demonstrada num estudo realizado em *Colletotrichum trifolii*, um fungo parasita da alfafa. Nesta espécie, mutações no oncogene Ras provocam uma elevação da concentração de ROS e consequentes alterações no seu crescimento e desenvolvimento (Chen & Dickman 2005). Observou-se que a Pro diminuiu a concentração de ROS e induziu o aumento de atividade da enzima antioxidante catalase, suprimindo deste modo a apoptose induzida pelas ROS (Chen & Dickman 2005). Alguns estudos demonstraram que a Pro livre ou os peptídeos contendo Pro podem reagir com ROS, como o radical HO^{*}, formando aductos estáveis (Liang et al. 2013). A capacidade que a Pro tem de reagir com o ¹O₂ parece ser também uma importante proteção contra o stresse fotooxidativo (Liang et al. 2013). Num estudo realizado numa cultura de células da derme humana expostas à radiação UV para indução de stresse fotooxidativo (Wondrak et al. 2005) observou-se que a Pro diminuiu a concentração de ¹O₂, suprimiu as lesões celulares e preveniu a apoptose, sugerindo que este AA suprime o stresse fotooxidativo e a carcinogénese da pele (Wondrak et al. 2005).

A Pro funciona também como agente quelante de metais pesados, que atuam como catalisadores em reações químicas responsáveis pela produção de ROS extremamente reativas e tóxicas (Sharma et al. 1998; Liang et al. 2013) e reduz o teor de metais livres devido à formação de complexos metal-Pro (Sharma et al. 1998).

Um outro mecanismo pelo qual a Pro protege contra o stresse oxidativo envolve a estabilização de proteínas e enzimas antioxidantes e o aumento de atividade das mesmas. Este efeito deve-se à capacidade que a Pro tem de ser uma molécula *chaperone*, prevenindo também a agregação proteica e a termodesnaturação. Desta forma, a Pro aumenta a tolerância ao stresse, ajudando a estabilizar enzimas que neutralizam as ROS (Natarajan et al. 2012; Liang et al. 2013).

Em concentrações fisiológicas, as ROS são importantes para a sinalização celular responsável pela ativação de respostas adaptativas e de sobrevivência celular ou apoptose. Alguns estudos têm demonstrado o papel protetor da Pro na prevenção da morte celular induzida pelo stresse oxidativo (e.g. stresse induzido pelo tratamento com H₂O₂ (Krishnan et al. 2008; Natarajan et al. 2012). Um dos mecanismos envolvidos na proteção conferida pela Pro envolve a produção de ROS resultante do seu metabolismo pela enzima POX/PRODH. Estas espécies podem ativar vias de sinalização protetoras que determinam a expressão de enzimas antioxidantes e a indução de vias de sobrevivência celular (Natarajan et al. 2012; Liang et al. 2013). Na **figura 3**, encontram-se

representadas as vias ativadas pela Pro em situação de stresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 na linha celular de melanoma WM35. A pré-exposição destas células à Pro diminuiu o dano oxidativo lipídico e proteico por exposição subsequente ao H_2O_2 (Natarajan et al. 2012). Estes efeitos parecem ser mediados pela PRODH, já que o silenciamento do gene que codifica esta enzima aboliu os efeitos protetores da Pro. O catabolismo da Pro via PRODH foi ainda responsável pela manutenção das concentrações de ATP e NADPH durante o stresse oxidativo e pela ativação da cínase específica para os aminoácidos serina/treonina (AKT) que é responsável pela inibição de vias apoptóticas, promovendo assim a sobrevivência celular (Natarajan et al. 2012). Deste modo, a Pro foi capaz de proteger as células contra o stresse induzido pelo H_2O_2 (Natarajan et al. 2012).

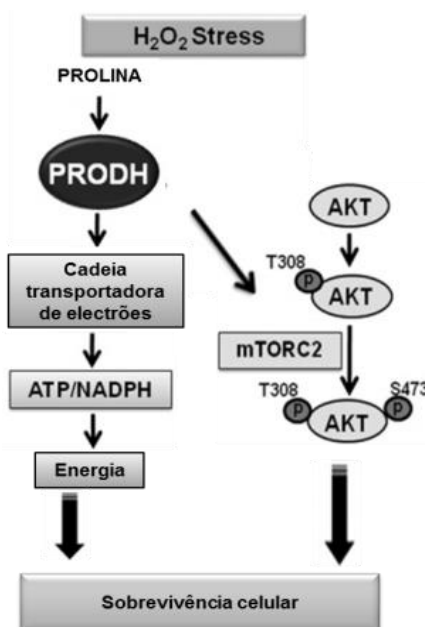


Figura 3 - Mecanismos ativados pela Pro em resposta ao stresse oxidativo.

(Figura adaptada de Natarajan et al. 2012).

H_2O_2 – peróxido de hidrogénio; PRODH – prolina desidrogenase; ATP – adenosina trifosfato; NADPH – forma reduzida do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina; AKT – proteína cinase B; mTORC2 – proteína alvo da rapamicina nos mamíferos

Num estudo de Krishnan e colaboradores observou-se também que a Pro protegeu as células contra o stresse oxidativo induzido por vários agentes oxidantes (H_2O_2 , *tert*-butil-hidroperóxido e fumonisina) e preveniu a apoptose (Krishnan et al. 2008). Esta proteção parece estar relacionada com a preservação do reservatório intracelular de GSH que desempenha um papel importante na manutenção da homeostasia redox.

Neste estudo verificou-se ainda que a sobreexpressão de enzimas envolvidas na biossíntese da Pro duplicou a quantidade de Pro, reduziu significativamente a concentração de ROS e aumentou a sobrevivência celular comparativamente com as células controlo (Krishnan et al. 2008). Por outro lado, a exposição de várias linhas celulares a concentrações fisiológicas de H_2O_2 também aumentou a expressão de enzimas da biossíntese da Pro, o que sublinha o papel protetor da Pro em resposta ao stresse oxidativo (Krishnan et al. 2008).

Em resumo, a Pro tem um duplo efeito no ambiente redox, podendo exercer proteção celular quer pelos seus efeitos antioxidantes diretos e indiretos, quer pela indução de vias de sobrevivência induzidas por ROS resultantes do seu metabolismo pela PRODH (Krishnan et al. 2008; Phang et al. 2010).

1.5) Objetivos

A Pro é um potente antioxidante que exerce um papel protetor contra o stresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 (Rodriguez & Redman 2005; Krishnan et al. 2008). Esta proteção parece ser mais completa do que a conferida por antioxidantes clássicos, como o ácido ascórbico, carotenóides e tocoferóis, que têm apenas capacidade de sequestrar radicais livres (Rodriguez & Redman 2005; Krishnan et al. 2008; Sousa, Afonso, et al. 2012). Como o H_2O_2 desempenha um papel importante na patogénese da hipertensão arterial, principalmente na hipertensão induzida pela Ang II, o tratamento com Pro poderá ser uma estratégia importante para reduzir a pressão arterial e a disfunção cardiovascular e renal.

Este estudo pretendeu assim avaliar a eficácia da Pro na prevenção da hipertensão arterial e no controlo da produção e eliminação de H_2O_2 em ratos tratados com Ang II. Foram objetivos específicos deste projeto:

- 1) Avaliar se a suplementação com Pro previne ou retarda o desenvolvimento de hipertensão arterial;
- 2) Avaliar o impacto do tratamento com Pro na produção renal de H_2O_2 e na atividade de enzimas antioxidantes neutralizadoras de H_2O_2 ;
- 3) Avaliar o impacto do tratamento com Pro em biomarcadores urinários de stresse oxidativo e de disfunção vascular.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1) Animais e desenho experimental

Foram utilizados 24 ratos macho Sprague Dawley, com um peso corporal inicial médio entre 200 e 250 g, provenientes da empresa Charles River Laboratories, Espanha. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, sob condições de fotoperíodo constante (ciclos luz-escuridão de 12 h), temperatura de 22°C, 40-50% de humidade relativa e com comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os regulamentos das autoridades locais para o manuseamento de animais de laboratório e com a Diretiva Europeia 2010/63/EU. Este protocolo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (ORBEA, FMUP). Estes animais foram sujeitos a um período de habituação aos procedimentos de manuseamento, pesagem, medição da pressão arterial, e permanência em gaiolas metabólicas.

Para a realização do estudo, foi utilizado um modelo de hipertensão arterial induzida pela infusão subcutânea (s.c.) de Ang II (Sousa, Oliveira, et al. 2012), durante 14 dias. A Pro foi administrada diariamente, na água de bebida, na dose de 2g/kg/dia (Tada et al. 2010), desde o dia 0 ao dia 21 (**figura 4**). A concentração das soluções de Pro foi diariamente ajustada de acordo com o consumo de bebida de cada animal. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente por 4 grupos experimentais, com um n de 6 animais cada:

- Grupo 1: Sham (tratamento: infusão s.c. de soro fisiológico (Sousa, Oliveira, et al. 2012), do dia 7 ao dia 21);
- Grupo 2: Ang II (tratamento: infusão s.c. de Ang II, 200 ng/kg/min (Sousa, Oliveira, et al. 2012), do dia 7 ao dia 21);
- Grupo 3: Sham + Pro (tratamentos: L-Prolina, 2 g/kg/dia (Tada et al. 2010), na água de bebida, do dia 0 ao dia 21; infusão s.c. de soro fisiológico, do dia 7 ao dia 21);
- Grupo 4: Ang II + Pro (tratamentos: L-Prolina, 2 g/kg/dia, na água de bebida, do dia 0 ao dia 21; infusão s.c. de Ang II, 200 ng/kg/min, do dia 7 ao dia 21).

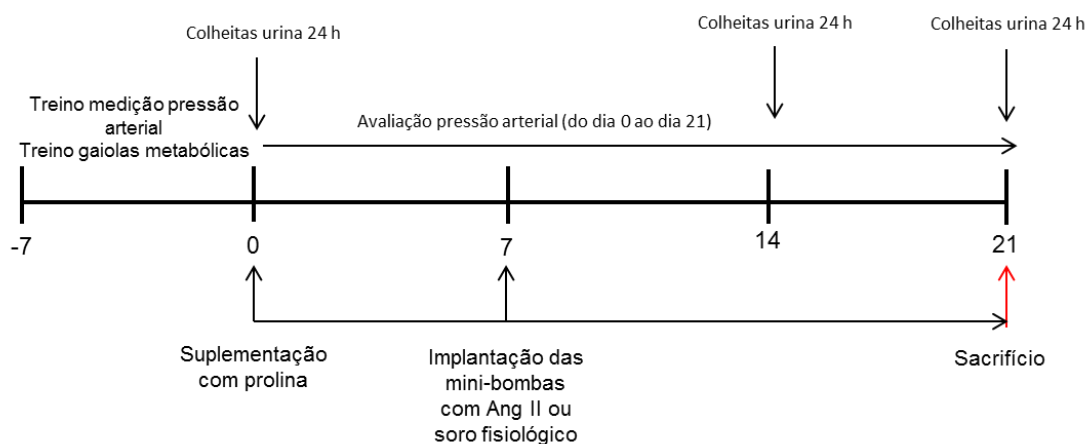


Figura 4 - Cronograma da atividade experimental.

2.2) Indução da hipertensão e avaliação da pressão arterial

A hipertensão arterial foi induzida pela infusão subcutânea de Ang II (200 ng/kg/min) durante 14 dias, utilizando minibombas osmóticas (Alzet 2002) que foram implantadas na região dorsal. Para este procedimento, os ratos foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Os grupos controlo (Sham e Sham + Pro) receberam uma infusão de soro fisiológico.

A pressão arterial sistólica foi avaliada ao longo do estudo em ratos despertos e pré-aquecidos a 38°C durante 10 a 15 min, pelo método não invasivo de medição na cauda, tendo sido utilizado um detetor de pulso fotoelétrico (LE 5000, Letica, Barcelona, Espanha). Para cada animal e cada situação experimental foram realizadas pelo menos 5 medições consecutivas cuja média aritmética foi utilizada para os restantes cálculos.

2.3) Colheita de urina, sangue e rins

Nos dias 0, 13 e 20, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e 24 h depois foi recolhida a urina. Posteriormente, as amostras foram divididas em alíquotas e armazenadas a -80°C até análise posterior. Nas alíquotas destinadas ao doseamento de isoprostanos foi adicionado o antioxidante butil-hidroxitolueno (BHT, 0,005%).

No dia 21, os animais foram anestesiados com isoflurano a 2% (Isoflo, Laboratórios Abbot) e procedeu-se à colheita de sangue, a partir do ventrículo esquerdo usando agulhas heparinizadas (Zentiva, 25000 UI/5 mL), seguida de perfusão com soro fisiológico para remoção do sangue dos órgãos e tecidos. Posteriormente efetuou-se a colheita dos rins. Após remoção da cápsula renal, separou-se a medula renal do córtex renal. Para cada animal, obtiveram-se 4 fragmentos de medula e 4 fragmentos de córtex renal. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C para análise posterior.

2.4) Homogeneização de tecidos

Alguns fragmentos corticais ou medulares renais foram homogeneizados para avaliação da atividade de enzimas antioxidantes. Esta homogeneização foi efetuada em 2 mL de solução tampão de fosfatos 50mM (KH_2PO_4 e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, na proporção de 1:1,5, pH 7,4, com 0,1% de Triton X-100). Em seguida, as amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 15700g, durante 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, dividido por alíquotas e armazenado a -80°C para análise posterior das atividades enzimáticas e quantificação de proteínas do sobrenadante.

Efetuuou-se também a homogeneização dos fragmentos corticais ou medulares renais, previamente utilizados no ensaio de quantificação da produção renal de H_2O_2 . Estas amostras foram homogeneizadas em 2 mL de tampão Krebs-Hepes (NaCl 118mM, KCl 4,5mM, CaCl_2 2,5mM, MgCl_2 1,2mM, KH_2PO_4 1,2mM, Na-HEPES 25mM, NaHCO_3 25mM e glucose 5mM; pH 7,4). Após a homogeneização, as amostras foram divididas em alíquotas e armazenadas a -80°C para quantificação posterior das proteínas totais.

Todas as homogeneizações foram efetuadas utilizando um homogeneizador Polytron. Os tecidos foram mantidos em gelo durante todo o procedimento.

2.5) Quantificação de proteínas

2.5.1) Quantificação de proteínas do sobrenadante

A quantificação de proteínas do sobrenadante das amostras de córtex ou medula, previamente homogeneizadas e centrifugadas, foi realizada para normalização dos cálculos da atividade enzimática em função do conteúdo de proteínas de cada tecido. Numa placa de 96 poços, adicionou-se um volume de 160 μL de água destilada em cada

poço, seguido de 10 µL de tampão de fosfatos 50mM pH 7,4 (branco) ou de 10 µL de soluções padrão de albumina (0,0625 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,250 mg/mL; 0,500 mg/mL e 1,00 mg/mL, em tampão de fosfatos 50mM pH 7,4) ou de 10 µL de amostra previamente diluída com o tampão de fosfatos 50mM pH 7,4. Adicionou-se depois um volume de 40 µL de reagente de proteínas (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad) em cada poço. Foi lida a absorvância das soluções na placa, a 595 nm, no espectrofotômetro de placas (BioTek-Powerwave HT). A concentração de proteínas foi expressa em mg/mL.

2.5.2) Quantificação de proteínas totais

Foi realizada a quantificação de proteínas totais para normalização dos cálculos da produção de H_2O_2 no córtex e medula renal em função do conteúdo de proteínas de cada tecido utilizado nesse ensaio. Numa placa de 96 poços adicionou-se, em cada poço, um volume de 160 µL de água destilada, seguido de 10 µL de uma solução de NaOH 0,5M (branco) ou de 10 µL de soluções padrão de albumina (0,0625 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,250 mg/mL; 0,500 mg/mL e 1,00 mg/mL em NaOH 0,5M) ou de 10 µL do homogeneizado total de cada amostra, previamente diluído em NaOH 0,5M. Adicionou-se depois um volume de 40 µL de reagente de proteínas (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad) em cada poço. Foi lida a absorvância das soluções na placa, a 595 nm, no espectrofotômetro de placas (BioTek-Powerwave HT). A concentração de proteínas foi expressa em mg/mL.

2.6) Doseamento de H_2O_2

2.6.1) Excreção urinária de H_2O_2

O H_2O_2 é uma ROS relativamente estável e excretada em quantidades detetáveis na urina (Halliwell et al. 2000; Sousa et al. 2008). A sua excreção urinária tem sido utilizada como biomarcador de stresse oxidativo em diversos estudos (Sousa et al. 2008; Sousa, Afonso, et al. 2012; Jin et al. 2009). A quantificação do H_2O_2 foi realizada por um ensaio espectrofluorimétrico, utilizando o kit Amplex Red Hydrogen Peroxidase/Peroxidase Assay (#A22188, Molecular Probes, Invitrogen), em amostras de urina de 24 h recolhidas nos dias 1, 14 e 21. Numa microplaca de 96 poços, adicionou-se um volume de 50 µL de soluções padrão de H_2O_2 ou de 50 µL de amostra de urina

previamente diluída com tampão fosfato de sódio pH 7,4 do *kit*, seguido de um volume de 50 μL de uma solução contendo Amplex Red (10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazina) e peroxidase de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP). Esta solução reage com o H_2O_2 presente nas amostras ou padrões numa estequiometria de 1:1, originando um produto vermelho fluorescente, a resorufina. Esta foi depois detetada num fluorímetro (Spectra MAX Gemini XS, Molecular Devices), selecionando comprimentos de onda de excitação e emissão de 570 e 585 nm, respetivamente. A excreção urinária de H_2O_2 foi calculada com base na concentração de H_2O_2 presente nas alíquotas de urina, no volume de urina de 24 h excretado e no peso de cada animal, tendo sido expressa em μmol de H_2O_2 por kg por dia.

2.6.2) Produção renal de H_2O_2

A produção de H_2O_2 foi avaliada no córtex renal e na medula renal. Cada tecido de cada animal foi incubado separadamente num tubo contendo 2 mL de meio Krebs-Hepes (NaCl 118mM, KCl 4,5mM, CaCl_2 2,5mM, MgCl_2 1,2mM, KH_2PO_4 1,2mM, Na-HEPES 25mM, NaHCO_3 25mM e glucose 5mM; pH 7,4), com oxigenação e a 37°C. Após 60 min, recolheram-se alíquotas de 50 μL do meio de incubação de cada tecido e quantificou-se a concentração de H_2O_2 nessas alíquotas por espectrofluorimetria, utilizando o kit *Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay*, de acordo com o procedimento acima descrito. A produção de H_2O_2 nos tecidos foi expressa em nmol/mg proteína.

2.7) Avaliação da atividade da catalase

A quantificação da atividade catalase foi feita com base na monitorização da decomposição do H_2O_2 por esta enzima. Numa microplaca, adicionou-se um volume de 100 μL do sobrenadante do homogeneizado de cada córtex ou medula, previamente diluído com tampão de fosfatos 50mM (KH_2PO_4 e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, na proporção de 1:1,5; pH 7,0), seguido de um volume de 50 μL de uma solução de H_2O_2 30mM, em tampão de fosfatos 50mM pH 7,0. A absorvância foi imediatamente lida a 240 nm, durante 40 segundos, no espectrofotómetro de placas (BioTek-Powerwave HT). Foram analisados triplicados de cada amostra. Os resultados foram calculados em função do coeficiente de extinção molar do H_2O_2 a 240 nm, 0,0394 $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, e foram expressos em Unidades de catalase/mg de proteína. Uma Unidade de catalase corresponde à quantidade de enzima necessária para degradar uma μmol de H_2O_2 por min.

2.8) Avaliação da atividade da GPx

A atividade da GPx foi avaliada pela monitorização da oxidação de NADPH em NADP^+ na presença de glutathione redutase (GR), a qual catalisa a redução da GSSG formada pela GPx. Num espectrofotómetro de placas (BioTek-Powerwave HT) foi efetuada a leitura da absorvância a 340 nm, a 37°C, durante 5 min, dos sobrenadantes dos homogeneizados das amostras de córtex ou medula, previamente diluídos, e aos quais foi adicionado tampão de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100mM; pH 7,0), Na_2EDTA (10mM), NaN_3 (10mM), GR (2,4 U/mL), GSH (10mM), NADPH (1,5mM) e H_2O_2 (1,5mM). As soluções de Na_2EDTA , NaN_3 e GR foram preparadas com o tampão fosfatos 100mM pH 7,0, as de GSH e H_2O_2 foram preparadas em água desionizada e o NADPH foi preparado em NaHCO_3 a 0,1%. Os resultados foram calculados em função do coeficiente de extinção molar do NADP a 240 nm, 6,22 mmol \cdot l \cdot cm $^{-1}$, e foram expressos nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

2.9) Doseamento de isoprostanos

Os isoprostanos são isómeros da prostaglandina $\text{F}_2\alpha$ formados, principalmente, pela peroxidação do ácido araquidónico, catalisada por ROS, e são amplamente reconhecidos e utilizados como biomarcadores de stresse oxidativo (Sousa, Afonso, et al. 2012). Os isoprostanos exercem ainda potentes efeitos vasoconstritores, contribuindo deste modo para a disfunção vascular (Sousa, Afonso, et al. 2012). As amostras de urina são particularmente indicadas para o doseamento de isoprostanos. Por um lado, o baixo conteúdo urinário de lípidos minimiza a formação *ex vivo* de isoprostanos. Além disso, como a maioria dos isoprostanos urinários provém da filtração de isoprostanos livres presentes na circulação sanguínea, a excreção urinária destes compostos é um bom marcador não invasivo do stresse oxidativo sistémico (Sousa, Afonso, et al. 2012).

O doseamento da excreção urinária de isoprostanos foi realizado em amostras de urina de 24 h dos dias 1, 14 e 21, por um ensaio imunoenzimático utilizando o Urinary Isoprostane ELISA Kit (#EA85, Oxford Biomedical Research). As amostras de urina foram pré-incubadas com a enzima β -glucuronidase, na proporção de 100 μL de urina para 5 μL de enzima, a 37°C, durante 2 h. Esta incubação serviu para quebrar a ligação dos isoprostanos conjugados com o ácido glucurónico. Em seguida, as amostras de urina foram analisadas segundo as instruções do fabricante do kit. A cada poço da placa ELISA, revestida com anticorpo para o isoprostano, foi adicionado um volume de 100 μL

de amostra ou padrão e, seguidamente, 100 µl de conjugado enzimático, com exceção do poço destinado à avaliação da absorvância inespecífica ao qual foi apenas adicionado tampão de diluição. Após uma incubação de 2h, efetuaram-se 3 lavagens com um volume de 300 µl de tampão de lavagem, com uma duração de 2-3 min cada. Seguidamente foi adicionado um volume de 200 µl do substrato tetrametilbenzidina que originou o desenvolvimento de cor azul. A placa foi novamente incubada durante 30 min e a absorvância foi imediatamente lida num espectrofotómetro de placas, a 650 nm. Após adição de H₂SO₄ 3N para paragem da reação enzimática, houve uma mudança de cor (de azul para amarelo) e a absorvância foi novamente lida a 450 nm. Este ensaio permite detetar a quantidade de conjugado enzimático ligado ao anticorpo. Como este conjugado compete com o isoprostano para a ligação ao anticorpo da placa, o desenvolvimento de cor é inversamente proporcional à quantidade de isoprostanos presente nas amostras e padrões.

A excreção urinária de isoprostanos foi calculada com base na concentração de isoprostanos presente nas alíquotas de urina, no volume de urina de 24 h excretado e no peso de cada animal, tendo sido expressa em ng de isoprostanos/kg/dia.

2.10) Doseamento de nitratos e nitritos

O NO[•] desempenha importantes funções nos sistemas cardiovascular e renal devido ao seu efeito vasodilatador (Briones & Touyz 2010). Esta molécula é rapidamente degradada em nitratos e nitritos que são lentamente excretados na urina. Como estes são relativamente estáveis nesta matriz biológica, a excreção urinária de NO[•] é considerada um biomarcador da disponibilidade endógena de NO[•] (Vaziri et al. 1998; Vaziri et al. 1999). A redução da excreção urinária de nitratos e nitritos pode também ser um indicador indireto de stresse oxidativo. Quando há uma elevada produção de O₂^{•-}, este reage rapidamente com o NO[•] determinando a sua inativação e consequente redução da sua disponibilidade biológica (Briones & Touyz 2010). Por outro lado, o excesso de ROS pode também contribuir para o desacoplamento das NOS e diminuir a produção de NO[•] (Briones & Touyz 2010; Sugamura & Keaney 2011).

Para o doseamento da concentração de nitratos e nitritos em amostras de urina de 24h dos dias 1, 14 e 21 foi realizado um ensaio colorimétrico, utilizando o Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (#780001, Cayman Chemical) de acordo com as instruções do fabricante. O processo de doseamento ocorreu em duas etapas. Na primeira efetuou-se a conversão de nitratos em nitritos pela enzima nitrato redutase, e no

segundo passo realizou-se a reação de Griess para quantificação de nitritos. A absorvância das amostras foi lida a 540 nm, no espectrofotômetro de placas (BioTek-Powerwave HT). A excreção urinária de nitratos e nitritos foi calculada com base na concentração de nitratos e nitritos presente nas alíquotas de urina, no volume de urina de 24 h excretado e no peso de cada animal, tendo sido expressa em $\mu\text{mol/kg/dia}$.

2.11) Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados recorrendo aos programas Microsoft® Office Excel™ 2010 e GraphPad Prism 6 e expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M.). Os resultados da avaliação da pressão arterial foram comparados por análise de variância bifactorial (two-way ANOVA) seguida do teste *post-hoc* de Tukey. Os restantes parâmetros foram analisados pelo teste de variância unifactorial (one-way ANOVA) seguido do teste de *post-hoc* de Tukey. Foram considerados significativos os valores de p inferiores a 0,05.

3. RESULTADOS

Para a análise de parâmetros ao longo do tempo, consideraram-se 4 grupos de animais desde o princípio do estudo, apesar da infusão de Ang II ou soro fisiológico só ter sido iniciada a partir do momento de implantação das mini-bombas, no sétimo dia do estudo. Deste modo foi possível analisar se os grupos, formados por distribuição aleatória dos animais, apresentavam alguma diferença intrínseca não relacionada com o(s) tratamento(s).

A partir do dia 7, o número de animais nos grupos Sham e Sham + Pro diminuiu para cinco e quatro, respetivamente, porque um rato do grupo Sham e dois ratos do grupo Sham + Pro não sobreviveram à anestesia usada para a realização das cirurgias.

Não foram observadas diferenças ao longo do tempo entre a dose de Pro ingerida pelos animais do grupo Sham + Pro e a ingerida pelos animais do grupo Ang II + Pro (dados não apresentados).

3.1) Estudo metabólico

3.1.1) Efeito da suplementação com Pro no peso corporal

A **figura 5** representa a evolução da média dos pesos (g) dos animais de cada grupo experimental, ao longo do tempo. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, exceto no dia 13, em que o grupo Ang II + Pro apresenta uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo Sham + Pro.

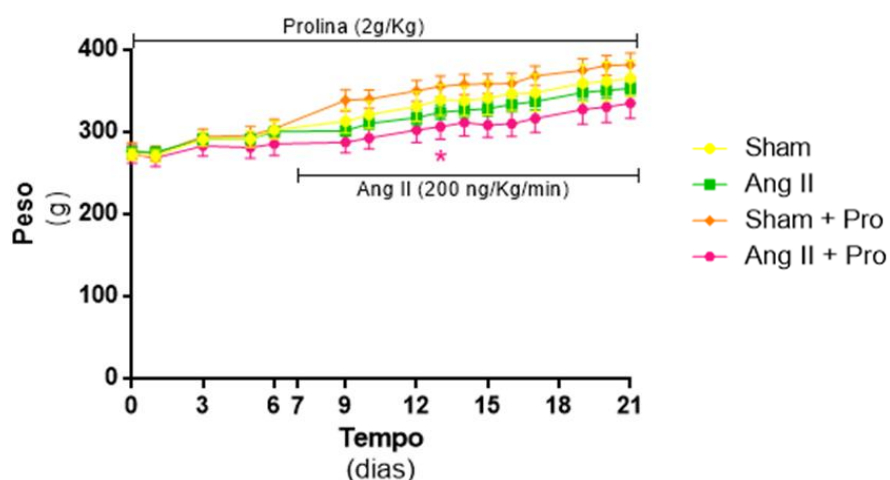


Figura 5 - Efeito da suplementação com Pro no peso corporal (g) de ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II, ao longo do tempo.

Resultados expressos como média \pm S.E.M.; n=4-6; * p<0,05 vs Sham + Pro

3.1.2) Efeito da suplementação com Pro na quantidade de comida ingerida

No gráfico da **figura 6**, encontra-se representada a evolução temporal da média da quantidade de comida ingerida em função do peso corporal (g/Kg) dos ratos. No dia 5, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da quantidade de comida ingerida nos animais do grupo Sham + Pro em comparação com os do grupo Sham e também nos animais do grupo Ang II + Pro em comparação com os animais do grupo Ang II. No dia 9, houve uma diminuição estatisticamente significativa de comida ingerida pelos animais do grupo Ang II + Pro em relação aos animais do grupo Ang II e Sham + Pro. Em contraste, no dia 21, houve um aumento significativo da quantidade de alimento ingerido pelos animais do grupo Ang II + Pro em comparação com o grupo Sham + Pro.

Observou-se, em todos os grupos, uma diminuição da quantidade de comida ingerida no dia 8 (primeiro dia após a cirurgia) e aumento para valores médios normais nos dias seguintes (dados não representados graficamente).

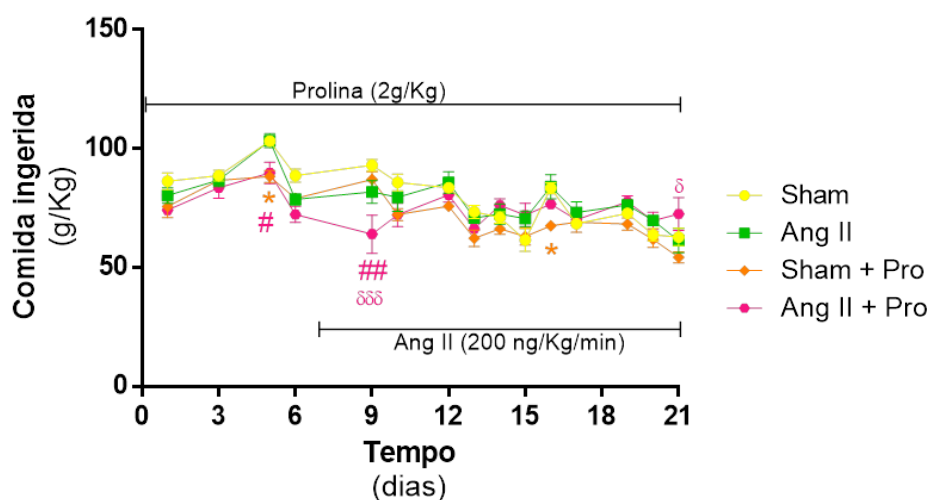


Figura 6 - Efeito da suplementação com Pro na quantidade de comida ingerida em função do peso corporal (g/Kg), em ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II, ao longo do tempo.

Resultados expressos como média \pm S.E.M.; n= 4-6; * p<0,05 vs Sham, # p<0,05 vs Sham, ## p<0,01 vs Ang II, δ p<0,05 vs Sham + Pro, δδδ p<0,001 vs Sham + Pro

3.1.3) Efeito da administração de Pro no volume de bebida ingerido

A administração de Pro e a infusão de Ang II aumentaram a quantidade de bebida ingerida (mL), como representado no gráfico da **figura 7**. Os animais do grupo Sham + Pro e Ang II + Pro beberam uma maior quantidade de água comparativamente com os animais do grupo Sham e Ang II, respetivamente. Este aumento foi estatisticamente significativo no dia 1, nos animais do grupo Sham + Pro em relação aos do grupo Sham, e nos dias 1, 3 e 5, nos animais do grupo Ang II + Pro comparativamente com os do grupo Ang II. Constatou-se ainda que, após a cirurgia, os animais tratados com Ang II ou Ang + Pro começaram a ingerir mais água do que os respetivos grupos controlo (Sham e Sham + Pro).

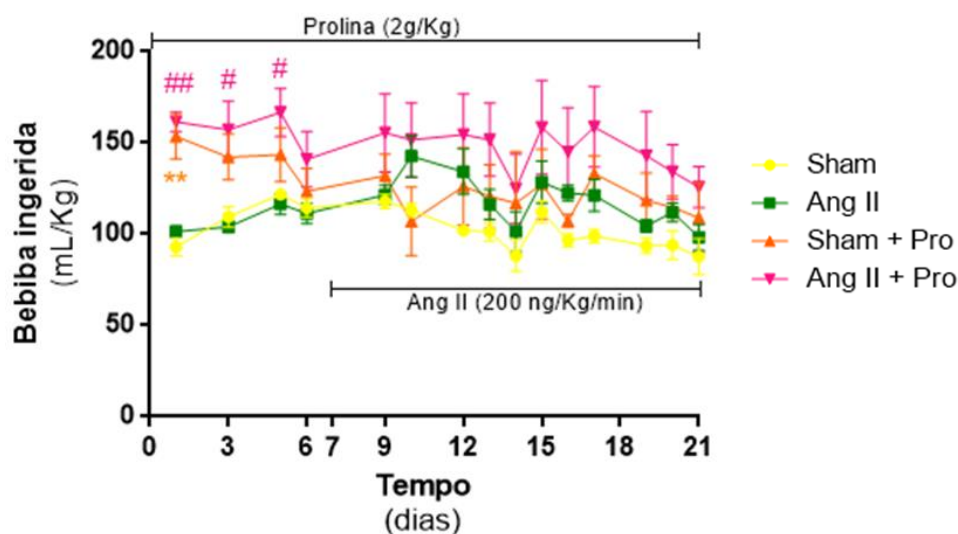


Figura 7 - Efeito da suplementação com Pro no volume de bebida ingerido em função do peso corporal (mL/Kg), em ratos controle (Sham) e tratados com Ang II, ao longo do tempo.

Resultados expressos como média \pm S.E.M.; $n = 4-6$; ** $p < 0,01$ vs Sham, # $p < 0,05$ vs Ang II, ## $p < 0,01$ vs Ang II

3.1.4) Efeito da administração de Pro na excreção de urina

Nos dias 1, 14 e 21 de tratamento foram recolhidas as urinas de 24 h. No gráfico da **figura 8**, estão representadas as médias da excreção de urina de 24h dos animais de cada grupo em função do peso corporal (mL/kg/dia).

Observou-se um aumento do volume de urina excretado nos animais aos quais foi administrada Pro, em comparação com os animais sem administração de Pro. Este aumento foi estatisticamente significativo no dia 1 entre os animais do grupo Sham + Pro e os do grupo Sham, e nos animais do grupo Ang II + Pro em comparação com os do grupo Ang II. Nos grupos não tratados com Pro, o volume de urina excretado pelos animais infundidos com Ang II (dia 14: $52,4 \pm 12,57$ mL/kg/dia; dia 21: $40,75 \pm 5,3$ mL/kg/dia) foi tendencialmente maior do que o volume excretado pelos animais do grupo Sham (dia 14: $m = 35,75 \pm 6,02$ mL/kg/dia; dia 21: $28,03 \pm 6,75$ mL/kg/dia), apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas.

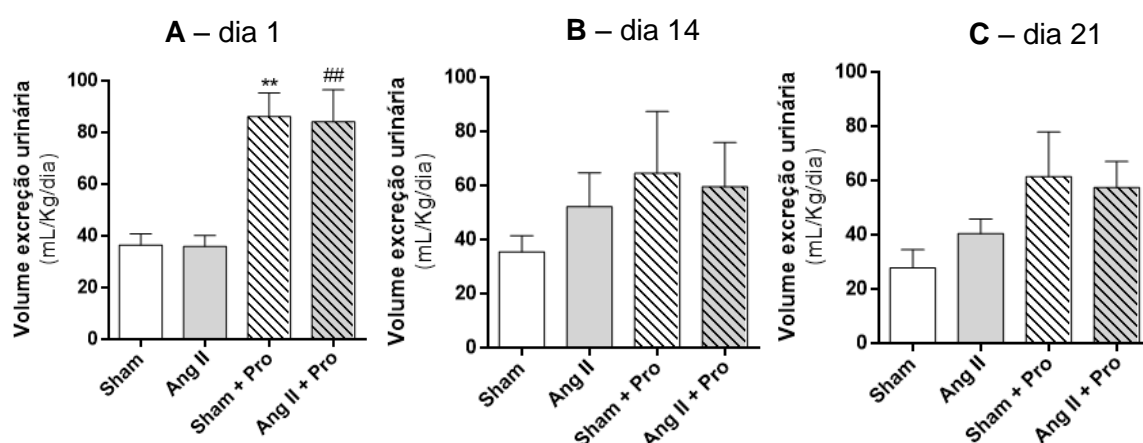


Figura 8 - Efeito da suplementação com Pro na excreção urinária (mL/Kg/dia), em ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II. (A) dia 1, (B) dia 14 e (C) dia 21.

Resultados expressos como média \pm S.E.M.; n= 4-6; ** p<0,01 vs Sham, ## p<0,01 vs Ang II

3.2) Efeito da administração de Pro na pressão arterial

A infusão de Ang II durante duas semanas aumentou significativamente a pressão arterial sistólica (d19: $164,7 \pm 8,9$ mmHg vs $127,3 \pm 4,8$ mmHg, p<0,001 Ang II vs Sham) (**figura 9**). O tratamento com Pro atenuou significativamente a elevação da pressão arterial sistólica induzida pela Ang II (d19: $134,0 \pm 2,3$ mmHg, p<0,001 vs Ang II) mas não alterou a pressão arterial dos ratos Sham (d19: $134,5 \pm 1,5$ mmHg).

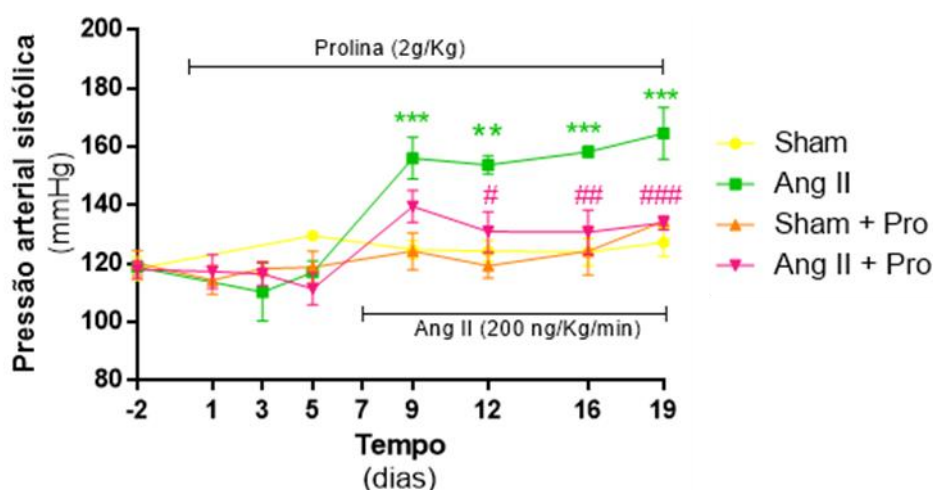


Figura 9 - Efeito da suplementação com Pro na pressão arterial sistólica (mmHg), de ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II.

Resultados expressos como média \pm S.E.M.; n= 4-6; ** p<0,01 vs Sham, *** p<0,01 vs Sham, # p<0,05 vs Ang II, ## p<0,01 vs Ang II, ### p<0,001 vs Ang II

3.3) Efeito da suplementação com Pro em marcadores urinários de stresse oxidativo

3.3.1) Excreção urinária de H₂O₂, isoprostanos e nitratos e nitritos

Foi avaliada a excreção urinária de H₂O₂ (μmol/kg/dia), isoprostanos (ng/Kg/24h) e de nitratos e nitritos (μmol/Kg/dia) nas amostras de urina 24 h recolhidas no dia 1, 14 e 21.

A **figura 10** representa os resultados obtidos no dia 1.

Os animais dos grupos tratados com Pro (Sham + Pro e Ang II + Pro) excretaram uma maior quantidade de H₂O₂ do que os animais dos grupos aos quais não foi administrada Pro (Sham e Ang II), como representado no gráfico **A**. No entanto, esta diferença foi estatisticamente significativa apenas nos animais do grupo Ang II + Pro em comparação com os do grupo Ang II.

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas na excreção urinária de isoprostanos entre os 4 grupos de tratamento.

Em relação à excreção urinária de nitratos e nitritos, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os 4 grupos para o dia 1, apesar de esta ser tendencialmente elevada nos animais tratados com Pro, relativamente aos animais sem suplementação com Pro.

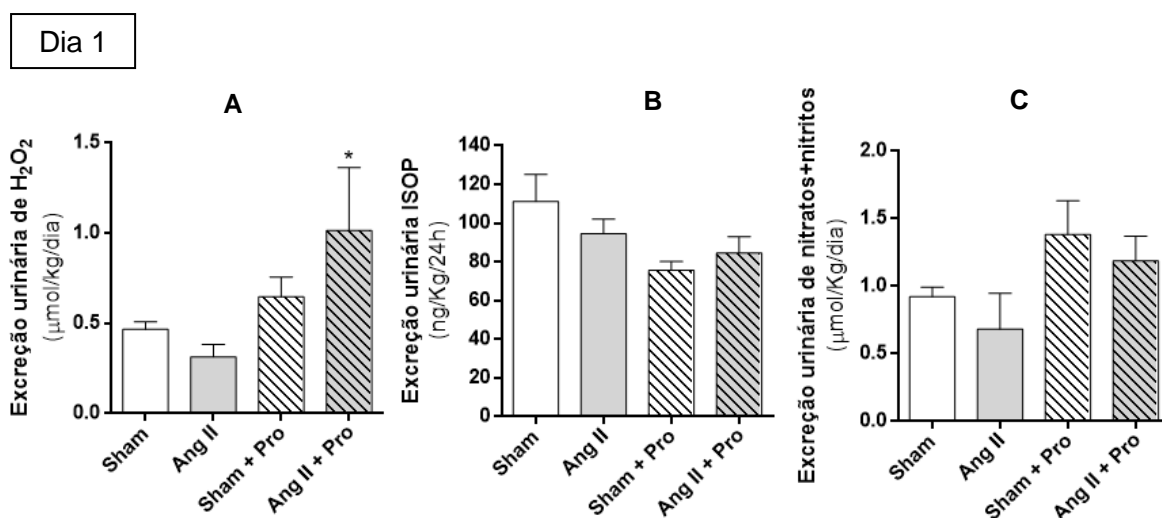


Figura 10 - Efeito da suplementação com Pro na excreção urinária de (A) H₂O₂ (μmol/kg/dia), (B) isoprostanos (ng/Kg/24h) e (C) nitratos e nitritos (μmol/Kg/dia) no dia 1, em animais controlo (Sham) e tratados com Ang II.

Resultados expressos como média ± S.E.M.; n= 4-6; * p<0,05 vs Ang II.

A **figura 11** representa os resultados obtidos no dia 14.

Os animais dos grupos Sham + Pro e Ang II + Pro excretaram tendencialmente mais H_2O_2 do que os animais do grupo Sham e Ang II, respetivamente, apesar destas diferenças não serem estatisticamente significativas.

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os 4 grupos na excreção urinária de isoprostanos.

Relativamente à excreção urinária de nitratos e nitritos, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa nos animais dos grupos Ang II e Sham + Pro em relação aos animais do grupo Sham. Nos animais do grupo Ang II + Pro, a excreção urinária de nitratos e nitritos foi semelhante à observada para os grupos Ang II e Sham + Pro.

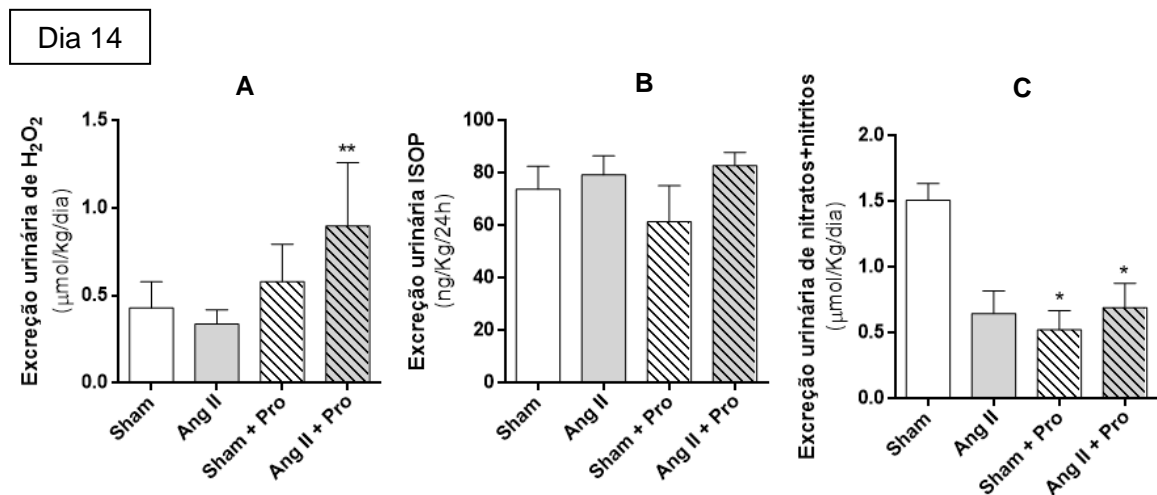


Figura 11 - Efeito da suplementação com Pro na excreção urinária de (A) H_2O_2 ($\mu\text{mol/kg/dia}$), (B) isoprostanos (ng/Kg/24h) e (C) nitratos + nitritos ($\mu\text{mol/Kg/dia}$) no dia 14, em animais controlo (Sham) e tratados com Ang II.

Resultados expressos como média \pm S.E.M.; n = 3-6; * $p < 0,05$ vs Sham; ** $p < 0,01$ vs Ang II

A **figura 12** representa os resultados obtidos no dia 21.

A excreção urinária de H_2O_2 aumentou significativamente nos animais do grupo Ang II + Pro em relação aos do grupo Ang II. Os restantes grupos não apresentaram diferenças significativas, apesar de haver um aumento tendencial da excreção de H_2O_2 nos animais do grupo Ang II e Sham + Pro em comparação com os do grupo Sham.

Relativamente à excreção urinária de isoprostanos, apesar de não se terem observado diferenças significativas entre os 4 grupos de tratamento, os animais do grupo Ang II apresentaram valores tendencialmente mais elevados.

A excreção urinária de nitratos e nitritos nos animais do grupo Ang II + Pro foi significativamente mais elevada do que nos animais do grupo Ang II e Sham + Pro. Entre os restantes grupos não houve diferenças significativas.

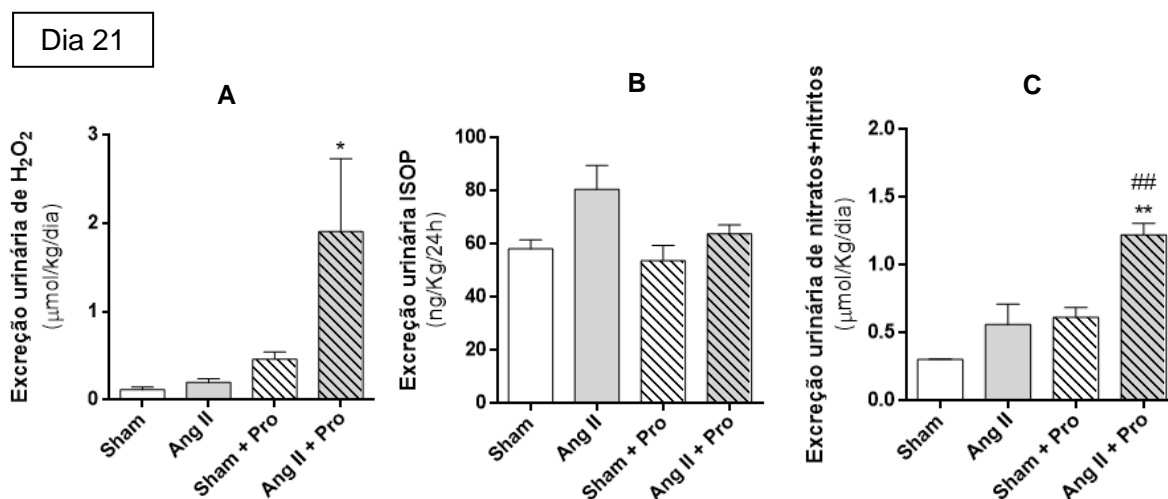


Figura 12 - Efeito da suplementação com Pro na excreção urinária de (A) H₂O₂ (μmol/kg/dia), (B) isoprostanos (ng/Kg/24h) e (C) nitratos e nitritos (μmol/Kg/dia) no dia 21, em animais controlo (Sham) e tratados com Ang II.

Resultados expressos como média ± S.E.M.; n= 3-6; * p<0,05 vs Ang II, ** p<0,01 vs Ang II, ## p<0,01 vs Sham + Pro

3.4) Efeito da suplementação com Pro na produção renal de H₂O₂ e na atividade de enzimas neutralizadoras de H₂O₂

3.4.1) Produção renal de H₂O₂ e atividade enzimática da catalase e GPx

Foi avaliada a produção de H₂O₂ (nmol/mg proteína), a atividade da catalase (U catalase/mg proteína) e da GPx (nmol NADPH oxidado/min/mg proteína) na medula e no córtex renal de ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II.

A **figura 13** representa os resultados obtidos na medula renal.

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na produção de H₂O₂ pela medula renal entre os 4 grupos de tratamento, apesar de haver um aumento tendencial nos animais do grupo Ang II.

A atividade da catalase na medula renal também não foi significativamente alterada pelos tratamentos com Pro e/ou Ang II.

A atividade da GPx na medula renal estava significativamente aumentada no grupo tratado com Ang II comparativamente com o grupo Sham. Por sua vez, nos animais do grupo Ang II + Pro houve uma diminuição significativa da atividade da GPx em relação aos animais do grupo Ang II.

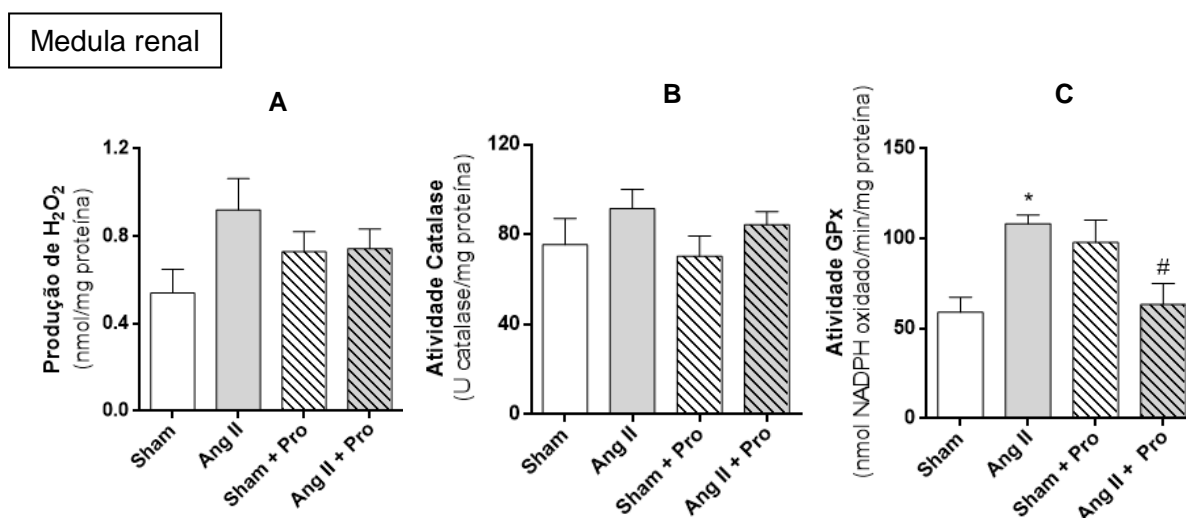


Figura 13 - Efeito da suplementação com Pro na (A) produção de H_2O_2 (nmol/mg proteína), (B) atividade da catalase (U catalase/mg proteína) e (C) - atividade da GPx (nmol NADPH oxidado/min/mg proteína) na medula renal de ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II. Resultados expressos como média \pm S.E.M.; n= 3-6; * p<0,05 vs Sham, # p<0,05 vs Ang II

A **figura 14** representa os resultados obtidos no córtex renal.

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na produção de H_2O_2 pelo córtex renal entre os 4 grupos de tratamento.

O tratamento com Pro e/ou Ang II não alterou significativamente a atividade da catalase e da GPx no córtex renal

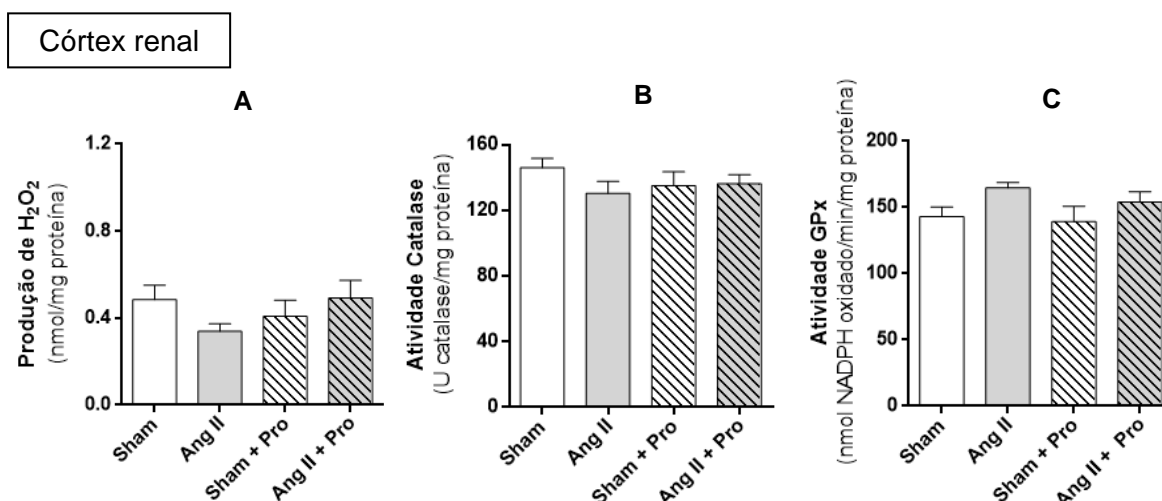


Figura 14 - Efeito da suplementação com Pro na (A) produção de H₂O₂ (nmol/mg proteína), (B) atividade da catalase (U catalase/mg proteína) e (C) - atividade da GPx (nmol NADPH oxidado/min/mg proteína) no córtex renal de ratos controlo (Sham) e tratados com Ang II.

Resultados expressos como média ± S.E.M.; n= 3-6;

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliada a eficácia da Pro na prevenção da hipertensão arterial e no controlo da produção e eliminação de H₂O₂ em ratos tratados com Ang II. A principal conclusão deste estudo é que a suplementação com Pro previne a elevação da hipertensão arterial causada pela Ang II e não altera a pressão arterial dos ratos controlo (Sham).

Tal como verificado anteriormente, a infusão de Ang II durante 14 dias aumentou marcadamente a pressão arterial sistólica (Sousa, Oliveira, et al. 2012). Nesse estudo, observou-se que a hipertensão causada pela Ang II estava associada a um aumento significativo da excreção urinária de H₂O₂, bem como a uma elevação da produção de H₂O₂ e da atividade da catalase na medula, mas não no córtex renal (Sousa, Oliveira, et al. 2012). Neste trabalho, o tratamento durante 14 dias com Ang II também induziu um aumento da excreção urinária de H₂O₂ e da produção de H₂O₂ na medula, mas não no córtex renal, comparativamente com o grupo Sham, apesar destas diferenças não serem estatisticamente significativas. O facto de se ter verificado um aumento significativo da atividade da GPx, mas não da catalase, na medula renal dos animais hipertensos, reforça a ideia de que, no presente estudo, a Ang II induziu um stresse oxidativo menos marcado

do que o observado anteriormente no mesmo modelo animal de hipertensão (Sousa, Oliveira, et al. 2012). É sabido que a GPx é uma defesa primária em condições de stresse oxidativo moderado enquanto a catalase é muito eficiente em situações de stresse oxidativo marcado em que se torna necessário neutralizar elevadas concentrações de H_2O_2 (Wassmann et al. 2004). A ausência de diferenças significativas na excreção urinária de outros marcadores de stresse oxidativo, como os isoprostanos, corrobora também a interpretação de que a disfunção redox induzida pela Ang II foi menos exuberante neste estudo.

Verificou-se que a atenuação da elevação da pressão arterial pela Pro nos animais infundidos com Ang II estava associada a uma diminuição tendencial da produção de H_2O_2 na medula renal, bem como a uma redução significativa da atividade medular renal da GPx, comparativamente com o grupo tratado só com Ang II. Por outro lado, os animais tratados com Ang II + Pro apresentaram também um aumento marcado da excreção urinária de H_2O_2 e da excreção urinária de nitratos e nitritos. Em estudos anteriores foram observados perfis semelhantes de alterações da excreção urinária de H_2O_2 e da produção de H_2O_2 na medula renal, sugerindo que a excreção urinária de H_2O_2 possa ser um biomarcador do stresse oxidativo medular renal (Jin et al. 2009; Sousa, Afonso, et al. 2012). No entanto, no presente trabalho, o marcado aumento da excreção urinária de H_2O_2 no grupo tratado com Ang II + Pro não reflete as alterações da produção de H_2O_2 na medula renal. Alguns estudos referem que a quantidade de H_2O_2 excretada na urina pode também ser determinada por fatores metabólicos e nutricionais (Halliwell et al. 2000; Halliwell et al. 2004; Campos et al. 2011). O facto de termos verificado também uma elevação marcada da excreção urinária de nitratos e nitritos neste grupo sugere que as alterações da excreção urinária de H_2O_2 e de nitratos e nitritos são sistémicas e resultam do metabolismo da Pro. É sabido que a Pro pode ser oxidada a pirrolina-5-carboxilato (P5C) pela POX/PRODH, num processo que origina ROS como o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 (Phang et al. 2010; Liang et al. 2013). Por outro lado, o ciclo da Pro está interligado com o ciclo da ureia, uma vez que a P5C pode ser convertido espontaneamente em semialdeído do glutamato e posteriormente em ornitina pela ornitina- δ -aminotransferase (Phang et al. 2008). A ornitina entra no ciclo da ureia, sendo convertida em ureia e também em arginina que é o substrato para a formação de NO^{\bullet} pelas enzimas NOS (Sugamura & Keaney 2011). As diferenças entre os grupos Sham + Pro e Ang II + Pro na excreção urinária de nitratos e nitritos podem dever-se ao facto de a Ang II estimular a expressão da NOS endotelial (Mollnau 2002). Este aumento da expressão da NOS endotelial, aliado a uma maior disponibilidade do substrato arginina resultante do metabolismo da Pro, pode explicar o aumento marcado da excreção urinária de nitratos e

nitritos no grupo Ang II + Pro. Por outro lado, o aumento significativo na excreção urinária de H_2O_2 no grupo Ang II + Pro, comparativamente com o grupo Sham + Pro, deve-se provavelmente ao efeito estimulador que a Ang II exerce na expressão e atividade de enzimas pró-oxidantes, como por exemplo as Nox (Paravicini & Touyz 2006; Briones & Touyz 2010), que produzem $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 (Briones & Touyz 2010). Apesar desta hipótese não ter sido testada, o tratamento com Ang II poderá também ter induzido um aumento da expressão e/ou atividade da POX/PROD, o que exacerbaria a produção e excreção de H_2O_2 nestes animais.

A excreção urinária de nitratos e nitritos é um importante biomarcador da disponibilidade endógena de NO^{\bullet} . Este é um importante vasodilatador que participa na regulação da pressão arterial (Li & Förstermann 2000). Nos vasos sanguíneos a perda da sua atividade é responsável pela disfunção endotelial, uma característica importante da hipertensão experimental e humana (Li & Förstermann 2000; Cuzzocrea et al. 2004). O NO^{\bullet} participa também na regulação da hemodinâmica e função excretora renal. A inibição da síntese de NO^{\bullet} aumenta a resistência vascular renal e reduz a excreção de sódio, contribuindo deste modo para a hipertensão arterial (Zou & Cowley 1999; Majid & Navar 2001). É provável que a prevenção da elevação da pressão arterial no grupo Ang II + Pro se tenha devido, principalmente, ao aumento marcado da produção de NO^{\bullet} em consequência de uma maior disponibilidade de substrato para a sua síntese. Esta elevação da produção de NO^{\bullet} poderá ser ainda responsável pela atenuação da produção de H_2O_2 e da atividade da GPx na medula renal dos ratos tratados com Ang II + Pro, comparativamente aos animais tratados só com Ang II, uma vez que a produção medular renal de H_2O_2 é influenciada pela pressão de perfusão renal que, por sua vez, depende da pressão arterial (Jin et al. 2009). Assim, do mesmo modo que o aumento da pressão arterial e consequente elevação da pressão de perfusão renal determinam um aumento da produção de H_2O_2 na medula renal (Jin et al. 2009), a redução da pressão arterial poderá também ser responsável pela diminuição da produção medular renal de H_2O_2 observada no grupo Ang II + Pro.

Os resultados deste estudo sugerem ainda que o aumento da produção de NO^{\bullet} contraria os potenciais efeitos prejudiciais que o aumento da disponibilidade de H_2O_2 , evidenciado pela elevação da sua excreção urinária, poderia ter na função cardiovascular e renal. É sabido que o H_2O_2 exerce vários efeitos pró-hipertensores, tais como o aumento da atividade simpática (Lin et al. 2003), aumento da vasoconstrição (Rodríguez-Martínez et al. 1998; Gao & Lee 2001; Gao et al. 2003; Gao et al. 2004; Thakali et al. 2006), hipertrofia e hiperplasia vascular (Ardanaz & Pagano 2006; Sousa et al. 2008), diminuição da diurese e natriurese (Chen et al. 2003; Asghar et al. 2006), ativação do

sistema renina-angiotensina (Sousa, Oliveira, et al. 2012) e amplificação do stresse oxidativo (Sousa, Oliveira, et al. 2012). Foi previamente demonstrado que a elevação da pressão de perfusão renal induz um aumento paralelo da produção de H_2O_2 e de NO na medula renal (Jin et al. 2009). Como estas moléculas exercem efeitos opostos na regulação da função renal e pressão arterial, o balanço entre elas é importante para a manutenção de uma relação pressão-natriurese “normal” e prevenção da hipertensão (Jin et al. 2009). É provável que, no nosso estudo, o aumento de NO^* no grupo Ang II + Pro tenha sido suficiente para compensar os efeitos da elevação do H_2O_2 , resultando na prevenção da hipertensão arterial induzida pela Ang II.

Neste trabalho avaliaram-se ainda os efeitos do tratamento com Pro no perfil metabólico dos animais controlo (Sham) e tratados com Ang II. A administração de Pro não alterou significativamente o ganho de peso corporal nem a quantidade de comida ingerida em ambos os grupos. Com estes resultados conclui-se que a dose de Pro administrada não provoca efeitos prejudiciais no desenvolvimento dos animais. Esta interpretação é corroborada pelos resultados obtidos num estudo realizado em 106 ratos Fischer, em que foi administrada Pro durante 90 dias (Tada et al. 2010). Nesse estudo observou-se que doses de Pro inferiores ou iguais a 2 g/Kg não causaram morte nem alterações do peso corporal e ingestão de comida (Tada et al. 2010).

No nosso trabalho, verificou-se ainda que a administração de Pro aumentou a ingestão de bebida. Este aumento foi significativo desde o dia 1 ao dia 7, nos dois grupos tratados com Pro. O efeito da Pro na ingestão de bebida deve-se provavelmente ao facto deste AA conferir um sabor adocicado à solução (Shallenberger 1993). Este aumento da ingestão de bebida causado pela Pro foi também previamente demonstrado no estudo realizado em ratos Fischer, acima referido (Tada et al. 2010). Constatou-se que, após a cirurgia, os animais do grupo Ang II começaram também a ingerir mais água, o que é explicado pelo efeito dipsogénico da Ang II que conduz a um aumento da necessidade de ingestão de água (Epstein et al. 1970). A combinação do efeito dipsogénico da Ang II com o efeito indutor da ingestão de bebida causado pela Pro é, também, provavelmente, a explicação para o facto de os animais do grupo Ang II + Pro serem os que ingeriram mais bebida ao longo do estudo.

Os animais tratados com Pro excretaram também um maior volume de urina do que os animais aos quais não foi administrada a Pro, sendo este aumento significativo no primeiro dia de tratamento com Pro. Este resultado pode dever-se ao facto de os animais destes grupos terem sido também os que ingeriram maior quantidade de bebida. Após o início da infusão de Ang II, as diferenças entre os grupos tratados, ou não, com Pro atenuaram-se provavelmente devido ao aumento da excreção urinária induzido também

pela Ang II, facto este já descrito anteriormente neste modelo de hipertensão (Diz et al. 1983).

Como foi já mencionado, a Pro é um AA capaz de induzir a produção de ROS através da sua degradação pela POX/PRODH, sendo também um potente antioxidante por mecanismos diretos ou indiretos. Deste modo, este AA tem um duplo efeito no ambiente redox (Krishnan et al. 2008; Phang et al. 2010). No nosso trabalho, apesar de o tratamento com Pro ter induzido um aumento significativo da excreção urinária de H_2O_2 , provavelmente devido ao aumento da atividade metabólica da POX/PRODH, este efeito não parece ter desencadeado um aumento do stresse oxidativo, já que não se observaram diferenças ao longo do estudo na excreção urinária de isoprostanos nos grupos tratados com Pro. Os isoprostanos são produtos de peroxidação lipídica amplamente reconhecidos como biomarcadores de stresse oxidativo (Sousa, Afonso, et al. 2012). A ausência de alterações na sua excreção sugere que o tratamento com Pro não causa efeitos tóxicos dependentes do stresse oxidativo.

Neste estudo foram ainda analisados os efeitos do tratamento Pro ao longo do tempo. Verificou-se que os efeitos da Pro na excreção urinária de H_2O_2 e na excreção urinária de nitratos e nitritos são observados quer agudamente (dia 1), quer cronicamente (dia 21) e que a infusão de Ang II durante duas semanas acentua estes efeitos da Pro. No entanto, uma semana após a cirurgia para implantação das bombas com Ang II ou soro fisiológico (dia 14), observou-se uma redução marcada do efeito da Pro na excreção urinária de nitratos e nitritos, quer no grupo Sham quer no grupo tratado com Ang II. Em contraste, nesse dia, o grupo Sham, não tratado com Pro, apresenta um aumento significativo da excreção de nitratos e nitritos comparativamente com os restantes grupos, e com os valores obtidos nos dias 1 e 21 do estudo. Embora não tenhamos conseguido esclarecer a causa destas alterações do dia 14, é provável que, no grupo Sham, estas resultem de efeitos pró-inflamatórios induzidos pela cirurgia, com consequente aumento da produção e eliminação de NO^* . Nos grupos tratados com Ang II e/ou Pro, como estas moléculas interferem também com a síntese de NO^* (Phang et al. 2008; Briones & Touyz 2010), os efeitos pró-inflamatórios da cirurgia poderão ter desencadeado mecanismos de compensação conducentes ao bloqueio da síntese de NO^* . É de sublinhar que no dia 14, além deste perfil alterado da excreção urinária de nitratos e nitritos, também não se observaram diferenças na excreção urinária de H_2O_2 e de isoprostanos nos animais tratados com Ang II comparativamente com o grupo Sham. Em contraste, no dia 21, o grupo Ang II apresentou um aumento tendencial da excreção urinária de H_2O_2 e de isoprostanos, relativamente ao grupo Sham, o que se assemelha mais ao observado por outros autores neste modelo de hipertensão (Sasser et al. 2010; Sousa, Oliveira, et al. 2012). Estes resultados indicam que, para a interpretação dos efeitos da Pro no stresse

oxidativo e disponibilidade de NO nos animais tratados com Ang II, só deveremos considerar os efeitos observados pelo menos duas semanas após a infusão de Ang II, uma vez que os procedimentos cirúrgicos podem induzir alterações bioquímicas que mascaram os efeitos dos tratamentos.

5. CONCLUSÃO

A administração prolongada de Pro não prejudicou o desenvolvimento e metabolismo dos animais, nem causou toxicidade dependente de stresse oxidativo.

O tratamento com Pro preveniu a elevação da pressão arterial induzida pela infusão de Ang II e aumentou significativamente a excreção urinária de nitratos e nitritos e a excreção urinária de H_2O_2 . Na medula renal, a Pro atenuou ainda o aumento da produção de H_2O_2 e o aumento da atividade enzimática da GPx induzidos pela Ang II. O efeito anti-hipertensor da Pro parece estar relacionado com a ligação deste AA ao ciclo de produção de arginina, o que terá favorecido o aumento da síntese de NO^* , evidenciado por uma maior excreção urinária de nitratos e nitritos. Os efeitos vasodilatador e natriurético do NO^* terão contribuído para a prevenção da elevação da pressão arterial causada pela Ang II.

Este estudo sugere assim que o desenvolvimento de bebidas ou alimentos funcionais suplementados com Pro poderá ter interesse para a prevenção de patologias cardiovasculares como a hipertensão arterial.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adams, E. & Frank, L., 1980. Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Annual review of biochemistry*.
- Addabbo, F., Montagnani, M. & Goligorsky, M.S., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension*, 53(6), pp.885–892.
- Ardanaz, N. & Pagano, P., 2006. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Experimental Biology and Medicine*.
- Asghar, M. et al., 2006. Hydrogen peroxide causes uncoupling of dopamine D1-like receptors from G proteins via a mechanism involving protein kinase C and G-protein-coupled receptor kinase 2. *Free radical biology & medicine*, 40(1), pp.13–20.
- Bader, M. et al., 2001. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *Journal of Molecular Medicine*, 79(2-3), pp.76–102.
- Badyal, D.K., Lata, H. & Dadhich, A.P., 2003. Animal models of hypertension and effect of drugs. , 35, pp.349–362.
- Bedard, K. & Krause, K.-H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), pp.245–313.
- Berry, C.E. & Hare, J.M., 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *The Journal of physiology*, 555(Pt 3), pp.589–606.
- Brasier, a R. et al., 2000. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Molecular and cellular biochemistry*, 212(1-2), pp.155–169.
- Briones, A.M. & Touyz, R.M., 2010. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Current hypertension reports*, 12(2), pp.135–142.
- Brown, D.I. & Griending, K.K., 2009. Nox proteins in signal transduction. *Free radical biology & medicine*, 47(9), pp.1239–1253.

- Cai, H., 2005. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circulation research*, 96(8), pp.818–822.
- Campos, C. et al., 2011. Evaluation of urinary biomarkers of oxidative / nitrosative stress in adolescents and adults with Down syndrome. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(7), pp.760–768.
- Carey, R.M. & Siragy, H.M., 2003. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine reviews*, 24(3), pp.261–271.
- Chen, C. & Dickman, M.B., 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), pp.3459–3464.
- Chen, Y.-F., Cowley, A.W. & Zou, A.-P., 2003. Increased H₂O₂ counteracts the vasodilator and natriuretic effects of superoxide dismutation by tempol in renal medulla. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 285(4), pp.R827–833.
- Chobanian, A. V. et al., 2003. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, 42(6), pp.1206–1252.
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E. & Dugo, L., 2004. Superoxide: a key player in hypertension. *The FASEB journal*, 18(1), pp.94–101.
- Danser, A.H.J. & Saris, J.J., 2002. Prorenin Uptake in the Heart: a Prerequisite for Local Angiotensin Generation? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(11), pp.1463–1472.
- Datla, S.R. & Griendling, K.K., 2010. Reactive oxygen species, NADPH oxidases, and hypertension. *Hypertension*, 56(3), pp.325–330.
- Direção-Geral da Saúde, 2013. *Hipertensão Arterial: definição e classificação*,
- Diz, D.I., Baer, P.G. & Nasjletti, A., 1983. Angiotensin II-induced Hypertension in the Rat. *J Clin Invest*, 72(August), pp.466–477.

- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), pp.47–95.
- Echeverri, N.P. & Mockus, I.S., 2008. Nuclear factor kB (NF-KB): signalosoma and its importance in cancer and inflammatory diseases. *Revista de la Facultad de Medicina*, 56(2), pp.133–146.
- Epstein, A.N., Fitzsimons, J.T. & Rolls, B.J., 1970. Drinking induced by injection of angiotensin into the rain of the rat. *The Journal of physiology*, 210(2), pp.457–474.
- Gao, Y.-J. et al., 2003. Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *British journal of pharmacology*, 138(6), pp.1085–1092.
- Gao, Y.-J. et al., 2004. Vascular relaxation response to hydrogen peroxide is impaired in hypertension. *British journal of pharmacology*, 142(1), pp.143–149.
- Gao, Y.J. & Lee, R.M., 2001. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production. *British journal of pharmacology*, 134(8), pp.1639–1646.
- Giestas, A., Palma, I. & Ramos, M., 2010. Sistema renina-angiotensina-aldosterona e sua modulação farmacológica. *Acta Médica Portuguesa*, 23, pp.677–688.
- Griendling, K.K., Murphy, T.J. & Alexander, R.W., 1993. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 87(6), pp.1816–1828.
- Griendling, K.K., Sorescu, D. & Ushio-Fukai, M., 2000. NAD(P)H Oxidase: Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circulation Research*, 86(5), pp.494–501.
- Guzik, T.J., Korbout, R. & Adamek-Guzik, T., 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 54(4), pp.469–87.
- Haddad, J.J., 2002. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular signalling*, 14(11), pp.879–897.
- Halliwell, B. et al., 2004. Establishing biomarkers of oxidative stress: the measurement of hydrogen peroxide in human urine. *Current medicinal chemistry*, 11(9), pp.1085–1092.

- Halliwell, B., Clement, M. V & Long, L.H., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS letters*, 486(1), pp.10–13.
- Harrison, D.G., 2013. The mosaic theory revisited: common molecular mechanisms coordinating diverse organ and cellular events in hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*, 7(1), pp.68–74.
- Hernandez Schulman, I., Zhou, M.-S. & Raij, L., 2007. Cross-talk between angiotensin II receptor types 1 and 2: potential role in vascular remodeling in humans. *Hypertension*, 49(2), pp.270–271.
- Hlebowicz, J. et al., 2011. Food patterns, inflammation markers and incidence of cardiovascular disease: the Malmö Diet and Cancer study. *Journal of internal medicine*, 270(4), pp.365–376.
- Houston, M. et al., 1999. Binding of Xanthine Oxidase to Vascular Endothelium: Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), pp.4985–4994.
- Jin, C. et al., 2009. Effects of renal perfusion pressure on renal medullary hydrogen peroxide and nitric oxide production. *Hypertension*, 53(6), pp.1048–53.
- Johnston, C. & Risvanis, J., 1997. Preclinical pharmacology of angiotensin II receptor antagonists: update and outstanding issues. *American journal of hypertension*, 10, pp.306–310.
- Kobori, H. et al., 2004. AT1 receptor mediated augmentation of intrarenal angiotensinogen in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*, 43(5), pp.1126–1132.
- Krishnan, N., Dickman, M.B. & Becker, D.F., 2008. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free radical biology & medicine*, 44(4), pp.671–681.
- Kristal, B. et al., 1998. Participation of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *American journal of hypertension*, 11(8 Pt 1), pp.921–928.

- Lacy, F. et al., 2000. Plasma Hydrogen Peroxide Production in Human Essential Hypertension: Role of Heredity, Gender, and Ethnicity. *Hypertension*, 36(5), pp.878–884.
- Lacy, F., O'Connor, D.T. & Schmid-Schönbein, G.W., 1998. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *Journal of hypertension*, 16(3), pp.291–303.
- Levens, N.R., Peach, M.J. & Carey, R.M., 1981. Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the control of renal function. *Circulation Research*, 48(2), pp.157–167.
- Li, H. & Förstermann, U., 2000. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *The Journal of pathology*, 190(3), pp.244–254.
- Liang, X. et al., 2013. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & redox signaling*, 19(9), pp.998–1011.
- Lin, H.. et al., 2003. Hydrogen peroxide increases the activity of rat sympathetic preganglionic neurons in vivo and in vitro. *Neuroscience*, 121(3), pp.641–647.
- Lindpaintner, K. & Ganten, D., 1991. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circulation research*, 68(4), pp.905–921.
- Macedo, M.E. de L. et al., 2007. Prevalência, Conhecimento, Tratamento e Controlo da Hipertensão em Portugal. Estudo PAP [2]. *Rev Port Cardiologia*, 26(May 2006), pp.21–39.
- Majid, D.S. & Navar, L.G., 2001. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *American journal of hypertension*, 14(6 Pt 2), p.74S–82S.
- Majzunova, M. et al., 2013. Redox signaling in pathophysiology of hypertension. *Journal of biomedical science*, 20(1), p.69.
- Malle, E., Buch, T. & Grone, H.-J., 2003. Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney international*, 64(6), pp.1956–1967.
- Mancia, G. et al., 2013. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the

European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC).

- Maraj, I. et al., 2013. Hypertension management in the high cardiovascular risk population. *International journal of hypertension*.
- Marvar, P.J. & Harrison, D.G., 2012. Stress-dependent hypertension and the role of T lymphocytes. *Experimental physiology*, 97(11), pp.1161–1167.
- Mollnau, H., 2002. Effects of Angiotensin II Infusion on the Expression and Function of NAD(P)H Oxidase and Components of Nitric Oxide/cGMP Signaling. *Circulation Research*, 90(4), p.58–65.
- Moreno, M.U. et al., 2003. Preliminary characterisation of the promoter of the human p22phox gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension. *FEBS Letters*, 542(1-3), pp.27–31.
- Natarajan, S.K. et al., 2012. Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death. *Free radical biology & medicine*, 53(5), pp.1181–1191.
- Nistala, R., Whaley-Connell, A. & Sowers, J.R., 2008. Redox control of renal function and hypertension. *Antioxidants & redox signaling*, 10(12), pp.2047–2089.
- Pacher, P., Nivorozhkin, A. & Szabo, C., 2006. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. , 58(1), pp.87–114.
- Page, I.H., 1949. Pathogenesis of arterial hypertension. *Journal of the American Medical Association*, 140(5), pp.451–458.
- Paravicini, T.M. & Touyz, R.M., 2006. Redox signaling in hypertension. *Cardiovascular research*, 71(2), pp.247–258.
- Paul, M., Poyan Mehr, A. & Kreutz, R., 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews*, 86(3), pp.747–803.
- Peach, M., 1977. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiological reviews*.

- Peach, M.J., 1977. Renin-Angiotensin System: Biochemistry and Mechanisms of Action. *Physiological reviews*, 57(2), pp.313–70.
- Pham-Huy, L.A., He, H. & Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science : IJBS*, 4(2), pp.89–96.
- Phang, J., Hu, C. & Valle, D., 2001. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. *Metabolism Clinical And Experimental*.
- Phang, J.M. et al., 2008. The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino acids*, 35(4), pp.681–690.
- Phang, J.M., Liu, W. & Zabirnyk, O., 2010. Proline metabolism and microenvironmental stress. *Annual review of nutrition*, 30, pp.441–463.
- Rodriguez, R. & Redman, R., 2005. Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(9), pp.3175–3176.
- Rodríguez-Martínez, M. a et al., 1998. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *British journal of pharmacology*, 125(6), pp.1329–1335.
- Sasser, J.M. et al., 2010. Asymmetric dimethylarginine in angiotensin II-induced hypertension. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 298(3), pp.R740–746.
- Shallenberger, R.S., 1993. *Taste Chemistry* G. Blackie Academic & Professional, ed.,
- Sharma, S.S., Schat, H. & Vooijs, R., 1998. In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry*, 49(6), pp.1531–1535.
- Simões e Silva, a C. et al., 2013. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *British journal of pharmacology*, 169(3), pp.477–492.
- Sousa, M.T. de J.T., 2006. *A hipertensão causada por um bloqueador dos receptores da adenosina. Papel do stresse oxidativo*. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

- Sousa, T., Afonso, J., et al., 2012. Lipid Peroxidation and Antioxidants in Arterial Hypertension. In D. A. Catala, ed.
- Sousa, T., Oliveira, S., et al., 2012. Role of H₂O₂ in hypertension, renin-angiotensin system activation and renal medullary dysfunction caused by angiotensin II. *British Journal of Pharmacology*, 166(8), pp.2386–2401.
- Sousa, T. et al., 2008. Role of superoxide and hydrogen peroxide in hypertension induced by an antagonist of adenosine receptors. *European journal of pharmacology*, 588(2-3), pp.267–276.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian journal of medical and biological research* 29(12), pp.1715–1733.
- Sugamura, K. & Keaney, J.F., 2011. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free radical biology & medicine*, 51(5), pp.978–992.
- Szabados, L. & Savaouré, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), pp.89–97.
- Tada, Y. et al., 2010. Toxicological evaluation of L-proline in a 90-day feeding study with Fischer 344 rats. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 58(1), pp.114–120.
- Thakali, K. et al., 2006. Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*, 47(3), pp.482–487.
- Touyz, R.M., 2003. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert review of cardiovascular therapy*, 1(1), pp.91–106.
- Unger, T., 2002. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *The American journal of cardiology*, 89(2A), p.3A–9A; discussion 10A.
- Vásquez-Vivar, J. et al., 1998. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), pp.9220–9225.

- Vaziri, N.D. et al., 1998. Downregulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: role of excess PTH. *The American journal of physiology*, 274(4 Pt 2), pp.F642–649.
- Vaziri, N.D., Liang, K. & Ding, Y., 1999. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney international*, 56(4), pp.1492–1498.
- Waring, W.S., 2002. Uric acid: an important antioxidant in acute ischaemic stroke. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*, 95(10), pp.691–693.
- Wassmann, S., Wassmann, K. & Nickenig, G., 2004. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, 44(4), pp.381–386.
- Wondrak, G.T., Jacobson, M.K. & Jacobson, E.L., 2005. Identification of quenchers of photoexcited States as novel agents for skin photoprotection. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 312(2), pp.482–491.
- Wu, G., 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*, 37(1), pp.1–17.
- Wu, G. et al., 2011. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino acids*, 40(4), pp.1053–1063.
- Wyse, A.T.S. & Netto, C.A., 2011. Behavioral and neurochemical effects of proline. *Metabolic brain disease*, 26(3), pp.159–172.
- Xu, Z. et al., 2011. Ambient particulate air pollution induces oxidative stress and alterations of mitochondria and gene expression in brown and white adipose tissues. *Particle and fibre toxicology*, 8(1), p.20.
- Yang, H. & Shi, M., 2003. Reduction of pressor response to vasoconstrictor agents by overexpression of catalase in mice. *American journal of Hypertension*, 16, pp.1–5.
- Young, I. & Woodside, J., 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54, pp.176–186.

Zou, A.-P. & Cowley, A.W., 1999. Role of nitric oxide in the control of renal function and salt sensitivity. *Current hypertension reports*, 1(2), pp.178–186.